

Zum Mechanismus des
oxydativen Stoffwechsels
von Oestron in Rattenleber

München 1964

Friedrich Marks

Franz Frank ■ Fotodruck – Formulare – Dissertationen ■

8 MÜNCHEN 23

Werneckstrasse 27

☎ 34 36 51

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Prof. Dr. Adolf Butenandt

Z u m M e c h a n i s m u s d e s
o x y d a t i v e n S t o f f w e c h s e l s
v o n O e s t r o n i n R a t t e n l e b e r

Ein Beitrag zur Kenntnis mikrosomaler
Hydroxylierungsvorgänge

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von
Friedrich Marks
aus Berlin

1964



1. Berichterstatter: Dozent Dr.E.Hecker / Prof. Dr.A. Butenandt
2. Berichterstatter: Prof. Dr.F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Juli 1964

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter der Leitung von Herrn Dozenten Dr.E. Hecker in der Zeit von Juni 1961 bis Februar 1964 durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. A. Butenandt für die wohlwollende Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dozenten Dr.E. Hecker danke ich für viele interessante Anregungen und fördernde Ratschläge sowie für die Überlassung von Ausgangssubstanzen.

Dank schulde ich ferner Fräulein Ch. Poppe und Fräulein I. Ehrhardt für die Messung von UV- und IR-Spektren.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I n h a l t

	Seite
I) <u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
II) <u>Substanzen und Methoden</u>	9
A) Allgemeine Methoden	9
1.) Chromatographie	9
2.) Messung von Radioaktivitäten	10
3.) UV-Extinktionsmessungen	10
4.) Zellfraktionierung	10
B) Substanzen	12
1.) Oestron-(16- ¹⁴ C)	12
2.) 2- und 4-Hydroxy-oestron und ihre 2,4-Di-nitrophenylhydrazone	12
3.) 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β)	16
4.) Dinitrophenylhydrazone anderer Hydroxy-oestrone	16
5.) Dihydrofolsäure	17
6.) Weitere Substanzen	17
C) Enzymatische Ansätze und ihre Aufarbeitung	18
1.) Gewinnung von Mikrosomen	18
2.) Zusammenstellung von Inkubationsansätzen	18
3.) Inkubation und Aufarbeitung	20
4.) Isolierung von Oestron, 1-Hydroxy-, 2-Hydroxy- und 4-Hydroxy-oestron	21
5.) Isolierung von 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β) und 1,4-Dihydroxy-oestratrien-17-on	22
6.) Isolierung von 6- und 16-Hydroxy-oestronen sowie von 6- und 16-Oxo-oestron	24
7.) Untersuchung der mikrosomalen NADPH ₂ -Oxydation	25
D) Zum Problem der Reproduzierbarkeit und Signifikanz der Ergebnisse von "Carrier"-Experimenten	26
III) <u>Ergebnisse</u>	27
A) Bruttoumwandlung von Oestron durch Rattenleber unter oxydativen Bedingungen	27

	Seite
B) o-Hydroxylierung am aromatischen Kern und Proteinbindung	31
C) p-Hydroxylierung (17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β)) und Proteinbindung	44
D) Versuche zum Nachweis einer m-Hydroxylierung (1-Hydroxy-oestron)	53
E) Versuche zum Nachweis einer Dienon-Phenol-Umlagerung von 17-Oxo-oestra-p-chinol	54
F) Hydroxylierungen in aliphatischen Positionen (6- und 16-Hydroxy-oestron sowie mögliche Folgeprodukte)	55
G) Vergleichende kinetische Untersuchungen von aliphatischer und aromatischer Hydroxylierung, Proteinbindung und Bruttometabolisierung des Oestrone	57
1.) Aliphatische Hydroxylierung	57
2.) 2-Hydroxylierung und Proteinbindung	58
3.) Die Wirkung von Zellüberstand	60
H) Zur mikrosomalen NADPH ₂ -Oxydation	63
IV) <u>Diskussion</u>	68
I) Das Verhältnis der mikrosomalen Stoffwechselreaktionen des Oestrone zueinander	68
II) Die Oestronhydroxylierungen als Spezialfälle unspezifischer mikrosomaler Hydroxylierungen	77
III) Zum Mechanismus der mikrosomalen Hydroxylase	81
V) <u>Zusammenfassung</u>	90

I) Einleitung und Problemstellung

Hormone sind endogene chemische Regulatoren. Daher rufen sowohl Ausfall als auch Übersteigerung ihrer Produktion schwere funktionelle Störungen hervor, so daß es für den Organismus wesentlich ist, die Bildung der "chemischen Sendboten" regulieren und den äußeren und inneren Erfordernissen anpassen zu können. Diesem Zweck dienen eine Reihe zentral gesteuerter Regelkreise, die jedoch nur dann einwandfrei funktionieren können, wenn außerdem ein rasch wirkender Mechanismus für die Inaktivierung und Ausscheidung einmal produzierten Hormons sorgt. Dieses Zusammenspiel zwischen Biogenese und Abbau hat besondere Bedeutung für solche Hormone, die ihre Wirkung nicht kontinuierlich sondern periodisch entfalten. Ein klassisches Beispiel sind die Follikelhormone (Oestrogene).

Schon recht früh - etwa gleichzeitig mit der Isolierung - erkannte man, daß Oestrogene durch Säugetiergewebe (1,2), darunter in erster Linie durch die Leber (3), enzymatisch so verändert werden können, daß ihre biologische Aktivität verloren geht. Jedoch erst die Einführung moderner Methoden wie Chromatographie und Isotopenmarkierung erlaubte es, die sich dabei abspielenden chemischen Vorgänge genauer zu erforschen. Zwar wurden zwei Primärprodukte der Inaktivierung, nämlich Oestren (4,5,6) und Oestriol (7) schon vor dem eigent-

- (1) R.A.Fee, G.F.Marrian u. A.S.Parkes, J.Physiol. 67, 377 (1929)
- (2) F.Silberstein, K.Molnar u.P.Engel, Klin.Wochenschr. 12, 1694 (1933)
- (3) B.Zondek, Skand.Arch.Physiol. 70, 133 (1934)
- (4) A.Butenandt, Naturwissenschaften 17, 879 (1929)
- (5) E.A.Doisy, C.D.Veler, S.A.Thayer, Am.J.Physiol. 90, 329 (1929)
- (6) E.Dingemans, S.E.deJongh, S.Kober, E.Laqueur, Dtsch. med.Wochschr. 1930, 301
- (7) G.F.Marrian, Biochem.J. 24, 435 (1930)

lichen Oestrogen, dem Oestradiol-(17 β) (8), isoliert, aber lange nicht als solche erkannt. Erst in jüngster Zeit konnte der Streit, welches der drei phenolischen Steroide als das Follikelhormon anzusprechen ist, zugunsten des Oestradiols-(17 β) entschieden werden (9,10); zugleich wurde gezeigt, daß im Organismus eine Bruttoumwandlung von Oestradiol-(17 β) in Oestron stattfindet und daß die wichtigsten Stoffwechselreaktionen überwiegend vom Oestron ausgehen (9) und sich vor allem in der Leber abspielen (10).

Die ersten Erfolge bei der Aufklärung der dabei entstehenden Metaboliten erzielten Marrian u. Mitarb., denen es ab Mitte der fünfziger Jahre gelang, eine Reihe von am Ring D oxydativ veränderten Oestrogenen aus Schwangerenurharn zu isolieren, nämlich 16-Epi-oestriol (11), 16 α -Hydroxy-oestron (12,13), 16 β -Hydroxy-oestron (14,15), 16-Oxo-oestradiol-(17 β) (15) und - als abweichenden Typ - auch 18-Hydroxy-oestron (16). Wenig später gelang in vivo und in vitro der Nachweis von 17-Epi-oestriol (17), 16-Epi-oestriol (17), 16-Oxo-oestron (18), 16-Oxo-oestradiol-(17 β) und -(17 α) (18). Diese

-
- (8) D.W.Corquodale, S.A.Thayer, E.A.Doisy, Proc.Soc.Exp.Biol. 32, 1182 (1935)
 - (9) J.Fishman, H.L.Bradlow, T.F.Gallagher, J.biol.Chemistry 235, 3104 (1960)
 - (10) E.V.Jensen, H.I.Jacobson, Recent Progr.Hormone Res. 18, 387 (1962)
 - (11) G.F.Marrian u. W.S.Bauld, Biochem.J. 58, XXXVI (1954), 59, 136 (1955)
 - (12) G.F.Marrian, E.J.D.Watson, M.Panattoni, Biochem.J. 65, 12 (1957)
 - (13) G.F.Marrian, K.H.Loke, E.J.D.Watson u. M.Panattoni, Biochem.J. 66, 60 (1957)
 - (14) D.S.Layne u. G.F.Marrian, Nature (London) 182, 50 (1958)
 - (15) D.S.Layne u. G.F.Marrian, Biochem.J. 70, 244 (1958)
 - (16) K.H.Loke, E.J.D.Watson, G.F.Marrian, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 26, 230 (1957)
 - (17) H.Breuer, L.Nocke, R.Knuppen, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 311, 275 (1958); Biochem.J. 71, 26 P (1959)
 - (18) H.Breuer, J.A.Breuer, C.G.Beling, Zf. in H.Breuer, Vitamins Horm. 20, 285 (1962)

und weitere Arbeiten (19-22) zeigten, daß Leber in der Lage ist, Oestrogene an C-16 zu hydroxylieren (wobei Oestron bevorzugt zu reagieren scheint (23)) und 16- und 17-ständige Hydroxylgruppen reversibel zu Oxofunktionen zu dehydrieren. Das Zusammenspiel dieser Reaktionen, von denen die NADPH_2 erfordernden Hydroxylierungen in der Mikrosomenfraktion (24) und die Dehydrierungen im Zellüberstand lokalisiert sind, zeigt Abbildung 1:

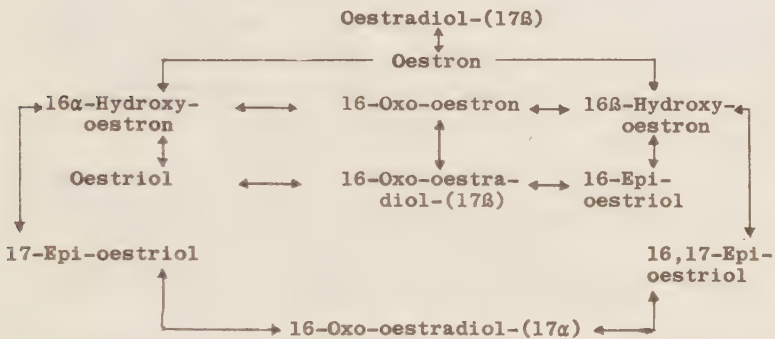


Abb. 1: Bildung und Zwischenstoffwechsel C-16-substituierter Oestrogene (vgl. auch (25)).

Neben diesen Reaktionen kennt man eine Reihe weiterer Stoffwechselwege der Oestrogene in der Leber, nämlich die Hydroxylierungen an C-2, C-6 und C-10 und die daran anschließenden Folgereaktionen.

- (19) M. Levitz, J.R. Spitzer, G.H. Twombly, J. biol. Chemistry 222, 981 (1956); J. biol. Chemistry 231, 787 (1958)
- (20) R.J.B. King, Biochem. J. 76, 7P (1960)
- (21) H. Breuer u. G. Pangels, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 322, 177 (1961)
- (22) H. Breuer, R. Knuppen, G. Pangels, Acta endocrinol. (Copenhagen) 30, 247 (1959)
- (23) J. Fishman, H.L. Bradlow, B. Zumoff, L. Hellman, T.F. Gallagher, Acta endocrinol. (Copenhagen) 37, 57 (1961)
- (24) G. Pangels u. H. Breuer, Naturwissenschaften 49, 106 (1962)
- (25) H. Breuer, Vitamins Horm. 20, 285 (1962)

In vivo wurde davon bisher nur die 2-Hydroxylierung nachgewiesen (26); sie scheint eine bedeutende Rolle innerhalb der Inaktivierungsvorgänge zu spielen, denn Fishman et al. (26) konnten nach Injektion von Oestradiol-(17 β)-[16-¹⁴C] 12% 2-Hydroxy-oestron und 7,2% 2-Methoxy-oestron aus menschlichem Urin isolieren. In vitro wurde die Reaktion mit Oestriol (27) und Oestradiol-(17 β) (28) beobachtet. Sie erfordert Sauerstoff und NADPH₂.

2-Hydroxylierte Oestrogene werden zum großen Teil als 2-Methyläther ausgeschieden und wurden als solche zuerst isoliert (29-32); während der Schwangerschaft erscheinen im Harn bis zu 1 mg 2-Methoxy-oestron pro Tag (33). Die Methylierung (34-36) wird durch eine von S-Adenosylmethionin abhängige lösliche O-Methyltransferase der Leber katalysiert (35,36); eine 2-Deomethylase findet sich in der Mikrosomenfraktion der Leber und benötigt ebenfalls NADPH₂ als Cofaktor (37).

Auch die 6-Hydroxylierung ist an das endoplasmatische Retikulum der Leber gebunden und benötigt NADPH₂ und O₂ (38). Ähnlich wie bei der 16-Hydroxylierung findet man, daß die α -Konfiguration gegenüber der β -Konfiguration vier- bis fünf-

-
- (26) J. Fishman, R.J. Cox, T.F. Gallagher, Arch.Biochem.Biophysics 90, 318 (1960)
 - (27) R.J.B. King, Biochem.J. 79, 355, 361 (1961)
 - (28) E. Hecker u. G. Nowoczek, Symp.Redoxfunkt.cytoplasmat. Strukturen, Wien 1962, S.105; Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem., im Druck
 - (29) S. Kraychy, T.F. Gallagher, J.Amer.chem.Soc. 79, 754 (1957); J.biol.Chemistry 229, 519 (1957)
 - (30) J. Fishman, T.F. Gallagher, Arch.Biochem.Biophysics 77, 511 (1958)
 - (31) K.H. Loke, G.F. Marrian, Biochim.biophysica Acta (Amsterdam) 27, 213 (1958)
 - (32) V.A. Frandsen, Acta endocrinol. (Copenhagen) 31, 603 (1959)
 - (33) R. Hobkirk, M. Nilsen, J.clin.Endocr.Metabolism 23, 274 (1963)
 - (34) L.R. Axelrod, P.N. Rao, J.W. Goldzieher, Arch.Biochem.Biophysics 87, 152 (1960); Arch.Biochem.Biophysics 94, 265 (1961); J.Clin.Endocr.Metabolism 21, 211 (1961)
 - (35) R. Knuppen, H. Breuer, G. Pangels, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 324, 108 (1961)
 - (36) H. Breuer, W. Vogel, R. Knuppen, Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem. 327, 217 (1962)
 - (37) C. Mittermayer, H. Breuer, Naturwissenschaften 49, 328 (1962)
 - (38) G.C. Mueller, G. Rumney, J.Amer.chem.Soc. 79, 1004 (1957)

mal bevorzugt ist (39). Beide Isomeren werden durch ein lösliches Leberferment reversibel zur 6-Oxo-Verbindung dehydriert (40-43). Man kann daher für die C-6-substituierten Oestrogene ein analoges Schema aufstellen wie für die in 16-Stellung oxydierten Derivate (Abb. 1).

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, daß Lebergewebe in der Lage ist, Oestrogene an Protein zu fixieren. Wie neuere Ergebnisse zeigen, muß man dabei zwei Bindungstypen unterscheiden, nämlich einerseits lockere Addukte des Steroids mit Albuminen, "Oestroprotein" genannt (44-47), andererseits stabile homöopolare Verbindungen, welche im Verlauf oxydativer Stoffwechselprozesse nachgewiesen werden konnten (48-52). Letztere Reaktion wird durch ein mikrosomales Enzymsystem der Leber katalysiert und ist an die Gegenwart von NADPH_2 und Sauerstoff gebunden (48-50). Die Natur des (oder der) die Proteinbindung eingehenden Metaboliten ist unbekannt.

Arbeiten zum Mechanismus dieses Vorganges führten zur Entdeckung der 10 β -Hydroxylierung, einer ebenfalls von NADPH_2

-
- (39) H.Breuer, R.Knuppen, G.Pangels, *Biochim.biophysica Acta* 65, 1 (1962)
 - (40) H.Breuer, L.Nocke, R.Knuppen, *Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem.* 315, 72 (1959)
 - (41) H.Breuer, L.Nocke, G.Pangels, *Acta Endocr.* 34, 359 (1960)
 - (42) H.Breuer, R.Knuppen, H.Schriebers, *Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem.* 319, 136 (1960)
 - (43) H.Breuer, R.Knuppen, G.Pangels, *Hoppe-Seyler's Z.physiol. Chem.* 321, 57 (1960); *Biochem.J.* 79, 32P (1961); *Biochim. Biophysica Acta* 65, 1 (1962)
 - (44) C.M.Szego, *Endocrinology* 52, 669 (1953) und spätere Arbeiten
 - (45) S.Roberts, C.M.Szego, *Annu.Rev.Biochem.* 24, 543 (1955)
 - (46) J.P.Horwitz, L.Horn, A.V.Loud, S.C.Brooks, *Experientia* 18, 414 (1962)
 - (47) S.C.Brooks, L.Horn, J.Jackson, A.V.Loud, J.P.Horwitz, *Biochim.Biophysica Acta* 74, 569 (1963)
 - (48) L.L.Riegel u. G.C.Mueller, *J.biol.Chemistry* 210, 249 (1954)
 - (49) E.Hecker u. G.C.Mueller, *J.biol.Chemistry* 233, 991 (1958)
 - (50) E.Hecker, S.M.A.D.Zayed, *Biochim.biophysica Acta* 50, 607 (1961); *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 325, 209 (1961)

und Sauerstoff abhängigen mikrosomalen Reaktion, welche am "Oestrogenmodell" 5,6,7,8-Tetrahydro-2-naphthol (49) und am Oestradiol-(17 β) (50,51,53) gezeigt wurde.

Die große Ähnlichkeit der Oestrogenhydroxylierungen sowie der Proteinbindungsreaktion hinsichtlich Lokalisierung und Cofaktorbedarf bewogen Hecker und Zayed (50), als Arbeitshypothese einen gemeinsamen Mechanismus für die Hydroxylierungen am aromatischen Ring und die Proteinbindung zu postulieren; danach soll primär eine homolytische Dehydrierung der phenolischen Hydroxylgruppe stattfinden, wobei ein mesomeriestabilisiertes Aroxylradikal entsteht, welches mit freiem oder enzymatisch aktiviertem Sauerstoff, mit Wasser oder mit geeigneten Akzeptoren am Protein in den Stellungen 2,4 und 10 reagieren kann; 4-Hydroxy-oestrogene wurden bisher noch nicht aufgefunden. Die auf diese Weise entstehenden hydroxylierten und an Protein gebundenen Metaboliten zeigen in den üblichen biologischen Testen keine oder stark verminderte Wirksamkeit, so daß das von Hecker und Zayed geforderte Enzymsystem als "inaktivierendes Prinzip" angesprochen werden kann.

Ein derartiger homolytischer Mechanismus könnte auch die Hydroxylierungen in den Positionen 6 und 16 erklären (52); er liefert dagegen keine Deutung der 11 β - und 18-Hydroxylierung (16,54,55), die jedoch nicht durch Enzyme der Leber, sondern durch wahrscheinlich spezifische Hydroxylasen in Nebennierenmikrosomen katalysiert werden und Seitenwege im Steroidstoffwechsel der Nebennierenrinde darstellen.

Hecker und Zayed postulierten ferner Folgereaktionen der primären Metaboliten, welche ebenfalls zur Proteinbindung, aber auch durch Abbau des Steroidgerüsts zu nicht-phenolischen und wasserlöslichen Produkten, welche verschiedentlich

(51) D.Betz, Dissertation, München 1963

(52) G.Nowoczek, Dissertation, München 1963

(53) E.Hecker, Chemiker-Ztg. 82, 588 (1958); Angew.Chem. 71, 744 (1959)

(54) R.Knuppen, H.Breuer, Biochim.biophysica Acta 58, 147 (1962)

(55) K.H.Loake, G.F.Marrian, W.S.Johnson, W.L.Mayer, D.D. Cameron, Biochim.biophysica Acta 28, 214 (1958)

gefunden (50,56-62), jedoch nie charakterisiert wurden, führen könnten.

Inaktivierungen von Oestrogenen lassen sich auch mit einigen anderen Fermenten, wie Peroxydasen (67-70) und Phenolasen (59, 63-67) erzielen; da bei diesen "Modellreaktionen" ebenfalls wasserlösliche und proteingebundene neben ätherlöslichen Metaboliten entstehen, sind sie für den Mechanismus der Inaktivierung von großem Interesse.

Weniger ein Inaktivierungs- als vielmehr ein Ausscheidungsmechanismus ist dagegen die bekannte Konjugation der Oestrogene und ihrer Stoffwechselprodukte mit Glucuron- und Schwefelsäure, welche durch eine mikrosomale UDP-Glucuronyltransferase bzw. eine lösliche Sulfokinase der Leber katalysiert wird.

-
- (56) A.J.Valcourt, S.A.Thayer, E.A.Doisy, jr., W.H.Elliott, E.A.Doisy, *Endocrinology* 57, 692 (1955)
 - (57) Ch.T.Beer, T.F.Gallagher, *J.biol.Chemistry* 214, 335 (1955)
 - (58) H.H.Wotiz, B.S.Ziskind, I.Ringler, *J.biol.Chemistry* 231, 593 (1958)
 - (59) P.H.Jellinck, *Biochem.J.* 71, 665 (1959)
 - (60) H.Breuer, zit. in Diczfalusy-Lauritzen, *Oestrogene beim Menschen*, S.91, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961
 - (61) G.Rumney, *Fed.Proc.* 15, 343 (1956)
 - (62) H.H.Wotiz, B.S.Ziskind, I.Ringler, *Biochim.biophysica Acta* 78, 466 (1963)
 - (63) P.H.Jellinck, *Biochim.biophysica Acta* 41, 37 (1960)
 - (64) W.W.Westerfeld, *Biochem.J.* 34, 51 (1940)
 - (65) M.Graubard, G.Pincus, *Proc.nat.Acad.Sci. USA* 27, 149 (1941)
 - (66) S.Bergstrom, H.Theorell, A.Westman, *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 19B, (6), 1 (1945)
 - (67) H.G.Williams-Ashman, S.Liao, P.Talalay in Pincus-Vollmer, *Biol.Action of Steroids in Relation to Cancer*, S. 151, Academic Press, New York 1960
 - (68) S.Klebanoff, S.J.Segal, *J.biol.Chemistry* 235, 52 (1960)
 - (69) P.H.Jellinck, L.Irwin, *Nature (London)* 192, 660 (1961)
 - (70) P.H.Jellinck, L.Irwin, *Nature (London)* 197, 1107 (1963)

In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, den enzymatischen Mechanismus der mikrosomalen Oestrogenhydroxylierungen, besonders der am aromatischen Kern angreifenden, sowie der Proteinbindung näher zu charakterisieren. Damit wird zugleich ein Beitrag zur Erforschung der mikrosomalen Hydroxylasen, der wichtigsten Gruppe gemischt-funktionaler Oxygenasen, geliefert.

II) Substanzen und Methoden

A) Allgemeine Methoden

1.) Chromatographie

Papierchromatographie: Absteigende Papierchromatographie hat sich als die brauchbarste Methode zur Isolierung und Vorreinigung des Oestrons und seiner Metaboliten aus biologischen Ansätzen erwiesen. Sie wird daher zumeist in mikropräparativem Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck wird die Probe als ca. 1cm breiter und 15-20 cm langer Streifen auf das Papier (Sorte Nr. 2043 b der Firma Schleicher und Schüll) aufgetragen. Man entwickelt das Chromatogramm in der üblichen Weise. Folgende Lösungsmittelsysteme wurden verwendet:

System 1:	mobile Oberphase Cyclohexan/Benzol	4:1
	stat. Unterphase Äthanol/Wasser	1:1
System 2:	mobile Oberphase Benzol	
	stat. Unterphase Methanol/Wasser	1:1
System 3:	mobile Oberphase Cyclohexan/Benzol	1:1
	stat. Unterphase Äthanol/Wasser	1:1.

Die Identifizierung erfolgt, falls die betreffende Verbindung nicht durchfallendes UV-Licht absorbiert, durch Referenzsubstanz, welche man zu beiden Seiten der Probe aufträgt und nach der Chromatographie durch eine spezif. Farbreaktion sichtbar macht; für Oestron und seine phenolischen Metaboliten hat sich Folin-Ciocalteaus Reagenz (71) bewährt, das mit o- und p-Diphenolen direkt und mit m-Diphenolen und Monophenolen nach "Räuchern" mit Ammoniakdampf eine blaue Färbung gibt. Die den Referenzflecken entsprechende Papierzone wird mit Methanol eluiert.

Dünnschichtchromatographie: Dünnschichtchromatographie wird einzeln zur Reinigung radioaktiv markierter Verbindungen verwendet. Man arbeitet präparativ; die Probe wird als ein Streifen zusammenhängender Flecken aufgetragen und nach der Chromatogra-

(71) O.Folin u. V.Ciocalteu, J.biol.Chemistry 73, 629 (1927)

phie durch ihre UV-Absorption oder mit Hilfe von Referenzsubstanz identifiziert. Als Trägermaterial dient Kieselgel G oder H der Fa. Merck, Darmstadt.

Säulenchromatographie: Man chromatographiert auf Aluminiumoxyd (Woelm) verschiedener Aktivitätsstufen oder auf Kieselgel (Merck), welches gegebenenfalls mit Wasser desaktiviert ist.

2.) Messung von Radioaktivitäten

Die Radioaktivität ^{14}C -markierter Substanzen wird im Durchflußzähler TGC-14 (Tracerlab), gekoppelt mit einem automatischen Probenwechsler, gemessen. Man trägt zu diesem Zweck die gelösten oder suspendierten Proben in möglichst gleichmäßiger Schicht zu je 0,5 - 2 mg auf Aluminiumplättchen auf und trocknet sie mit einer IR-Lampe bis zur Gewichtskonstanz.

Da Oestron und seine Abkömmlinge dazu neigen, übersättigte Lösungen und unregelmäßige Kristallisate zu bilden, empfiehlt es sich, die Kristallisation durch Reiben und Verühren mit einem dünnen Glasstab zu beschleunigen.

Ein ^{14}C -Standardpräparat erlaubt es, die im Mittel etwa 25 % betragende Zählrausbeute des Meßgerätes laufend zu kontrollieren, so daß eventuell auftretende Schwankungen rechnerisch ausgeglichen werden können.

Sämtliche Meßwerte werden für Untergrund und Selbstabsorption (Proteinstandard) korrigiert.

Zur Auswertung von Radiopapierchromatogrammen diene der Radiopapierchromatograph FH 407 (Friessecke und Höpfner).

3.) UV-Extinktionsmessungen

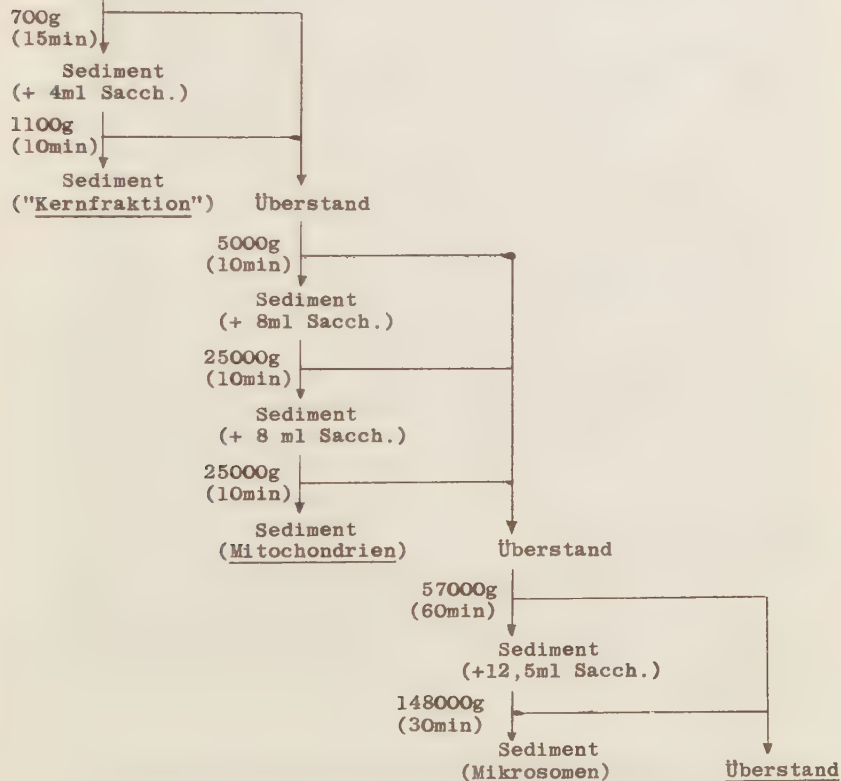
UV-Extinktionen werden in der üblichen Weise mit dem Spektrophotometer DU (Beckman) gemessen.

4.) Zellfraktionierung

Leberzellhomogenat wird in Anlehnung an die Vorschrift von

Hogeboom und Schneider (72) in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Das folgende Schema faßt die Fraktionierung, die mit Hilfe einer Servall-Zentrifuge (Rotor SS 34) und der Ultrazentrifuge Spinco L (Rotor Nr. 50) vorgenommen wird, kurz zusammen:

10ml 10%iges Homogenat in 0,25M-Saccharose



Die Sedimente werden in definierten Mengen isotonischer KCl-Lösung resuspendiert.

(72) G.H.Hogeboom u. W.C.Schneider in Chargaff-Davidson: "The Nucleic Acids", Academic Press, New York 1955, S. 212

Eine reinere Kernfraktion erhält man gesondert nach der Methode von Hogeboom, Schneider und Striebich (73), wobei die Kerne in Saccharoselösungen verschiedener Dichte und in Gegenwart von Calciumchlorid abgeschleudert werden. Zellüberstände höherer Konzentration stellt man durch ein- einhalbstündiges Zentrifugieren von 20%igem Homogenat in isoton. KCl bei 50 000 UpM (Spinco L, Rotor Nr. 50) her. Zur routinemäßigen Gewinnung von Mikrosomen wurde das in Abschnitt II, C beschriebene abgekürzte Verfahren angewendet.

B) Substanzen

1.) Oestron-(16-¹⁴C)

¹⁴C-markiertes Oestron der Fa. Radiochemical Centre, Amersham, England, (etwa 2,2 mg; Akt. 0,1 mC) wird mit 8 mg unmarkiertem Oestron "verdünnt". Zur Reinheitsprüfung wird ein Radiopapierchromatogramm im System 1 angefertigt. Eventuell vorhandene Verunreinigungen können chromatographisch auf Al₂O₃ (Akt.St. IV, sauer) durch Elution mit je 200 ml Benzol, Benzol/Chloroform (4:1) und Benzol/Chloroform (3:1) entfernt werden.

Die spezifische Aktivität des Präparates ermittelt man nach 4×10^3 -facher Verdünnung. Sie beträgt etwa 4×10^6 IpM/mg (die genauen Werte, welche mit der Zählzelle des Meßgerätes schwanken, sind bei der Beschreibung der Versuche angegeben).

2.) 2- und 4-Hydroxyoestron und ihre 2,4-Dinitro-phenyl- hydrazone

Die Darstellung der beiden o-Hydroxyoestrone folgt im wesentlichen bekannten Vorschriften, die jedoch verbessert und vereinfacht worden sind.

(73) G.H.Hogeboom, W.C.Schneider u. M.J.Striebich, J.biol. Chemistry 196, 111 (1952)

Zur Einführung der zweiten Hydroxylgruppe bedient man sich der Photolyse der entsprechenden Diazoniumsalze, welche aus den o-Nitroverbindungen über die o-Aminoverbindungen dargestellt werden. Die Hydroxylgruppe in Position 3 wird dabei durch Methylierung geschützt. 2- und 4-Nitro-oestron erhält man durch direkte Nitrierung in Eisessig (74).

Die Umwandlung der o-Nitro-oestrone in o-Hydroxy-oestron-3-methyläther wurde von Kraychy (75) beschrieben: man methyliert zunächst mit Dimethylsulfat und reduziert die Nitrogruppe anschließend mit Dithionit, wobei der o-Amino-methyläther in mäßiger Ausbeute (ca. 60 %) anfällt. Das Dithionitverfahren wird in der vorliegenden Arbeit durch eine katalytische Hydrierung mit Raney-Nickel ersetzt; man erhält damit bei praktisch quantitativer Ausbeute ein wesentlich reineres Produkt. Die photochemische Zersetzung der Diazoniumsalze geht letztenendes auf Arbeiten von de Jonge und Dijkstra (76) zurück; sie erfordert bei hoher UV-Intensität stark verdünnte mineralische Lösungen und tiefe Temperatur (0-10°). Die anschließende Reinigungsprozedur konnte gegenüber der Vorschrift von Kraychy vereinfacht und verbessert werden.

Fishman et al. beschrieben die zum o-Hydroxy-oestron führende Methylätherspaltung (77); die Autoren bedienen sich der Pyridinhydrochloridmethode nach Prey (78). Der Syntheseweg sei auf den folgenden Seiten kurz beschrieben. Alle dort angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

2- und 4-Nitro-oestron: Eine Lösung von 10 g Oestron in 250 ml Eisessig wird bei 35-40° tropfenweise und unter Rühren mit einem geringen Überschuß (ca. 5 %) Salpetersäure (Dichte ca. 1,24, stickoxydfrei, gegen 5n-NaOH eingestellt) versetzt. 4-Nitro-oestron fällt nach kurzer Zeit aus und wird nach 24 Stdn. abfiltriert. Das Filtrat gießt man in 1 ltr. Wasser, saugt den entstandenen Niederschlag ab, wäscht und trocknet und chromatographiert anschließend auf Al_2O_3 (Akt.St. IV, sauer, 4 x 100 cm), wobei man mit Benzol zunächst 2-Nitro-oestron, darauf mit Benzol/ $CHCl_3$ (9:1), (4:1), (1:1) rest-

(74) H.J.Werbin u. C.Holoway, J.biol.Chemistry 223, 651 (1956)

(75) S.Kraychy, J.Amer.chem.Soc. 81, 1702 (1959)

(76) J.de Jonge u. R.Dijkstra, Recueil Trav.chim.Pays-Bas 68, 426 (1949); 71, 846 (1952)

(77) J.Fishman, R.Lehman u. M.Tomasz, J.Org.Chemistry 25, 585 (1960)

(78) V.Prey, Chem.Ber. 74, 1219 (1941); 75, 350, 445 (1942)

liches 4-Nitro-oestron und schließlich mit Aceton 2,4-Dinitro-oestron eluiert. Man kristallisiert aus Äthanol um.

Ausbeuten und Eigenschaften:

	Ausbeute	Schmp.	Farbe
2-Nitro-oestron	5,2g (44%)	182-183°	gelb
4-Nitro-oestron	4,3g (37%)	ca. 270° (Zers.)	schwach gelb
2,4-Dinitro-oestron	1,9g (16%)	184-185°	hellgelb

4-Nitro-oestron-3-methyläther: Man löst 1,4g 4-Nitro-oestron in 75 ml Methanol + 45 ml 10%iger Kalilauge und versetzt die Lösung tropfenweise unter Rühren und im Stickstoffstrom mit Dimethylsulfat, bis die Farbe von Rot nach Gelb umschlägt. Darauf werden 2 ml 40%iger KOH zugesetzt, wobei sich die Lösung erneut rot färbt. Man fügt nun solange abwechselnd 40%ige KOH und tropfenweise Dimethylsulfat hinzu, bis praktisch kein Farbumschlag nach Rot mehr eintritt. Insgesamt sind etwa 50 ml Dimethylsulfat und 50 ml KOH erforderlich. Die Reaktionszeit beträgt 5-6 Stdn.; die Temperatur soll nie über 35° steigen. Die noch alkalische Lösung wird 1/2 Stde. in Eis gestellt, worauf man das Rohprodukt abfiltriert, mit 5%iger KOH und Wasser wäscht und i.V. trocknet. Nach Umkristallisation aus Äthanol/Benzol (1:1) erhält man fast farblose Kristalle, die bei 254-256° schmelzen und sich am Licht dunkel färben.

Die UV- und IR-Daten sind identisch mit den in der Literatur (75) angegebenen Werten.

2-Nitro-oestron-3-methyläther: 2,14 g 2-Nitro-oestron werden in 100 ml Methanol und 100 ml 10%iger KOH gelöst und in der gleichen Weise wie das 4-Isomere methyliert. Es sind etwa 70 ml Dimethylsulfat und 70 ml 40%ige KOH erforderlich. Die Rohausbeute beträgt 85-90 % d.Th. Gelbliche Kristalle vom Schmp. 156-157° (aus Äthanol/Benzol 1:1).

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (75).

4-Amino-oestron-3-methyläther: Eine konzentrierte Lösung von 4-Nitro-oestron-3-methyläther in Tetrahydrofuran wird nach Zusatz der gleichen Menge gewaschenem Raney-Nickel bei Zimmertemperatur bis zur Beendigung der Wasserstoffaufnahme hydriert.

Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhält man die farblose Aminoverbindung in quantitativer Ausbeute. Sie schmilzt nach Umkristallisation aus Methanol bei 189-191°.

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (75).

2-Amino-oestron-3-methyläther: 2-Nitro-oestron-3-methyläther wird in äthanolischer Lösung wie das 4-Isomere quantitativ hydriert.

Die farblose Aminoverbindung hat einen Schmp. von 172-173° (aus Methanol).

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (75).

4-Hydroxy-oestron-3-methyläther: Eine Lösung von 0,75 g 4-Amino-oestron-3-methyläther in 18 ml 10%iger Schwefelsäure wird bei 0° mit einer Lösung von 0,45 g Na-nitrit in 3 ml Wasser versetzt. Nach 30 min. fügt man 1,5 ml 40%ige Harnstofflösung in kleinen Portionen hinzu, verdünnt nach weiteren 5 min. mit einem halben Liter Eiswasser und bestrahlt das Gemisch 14 Stdn. bei 0-10° mit UV-Licht (verwendet wurde eine Analysen-Quarzlampe "Hanau" ohne Filter). Man extrahiert anschließend gründlich mit Äther und wäscht den Extrakt mit Wasser säurefrei. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleibt ein hellbraunes kristallisiertes Rohprodukt zurück. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ. Durch Umkristallisation aus Äthanol erhält man fast farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 221-224°.

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (75).

2-Hydroxy-oestron-3-methyläther: 1 g 2-Amino-oestron-3-methyläther wird in 50 ml 10%iger Schwefelsäure unter Erwärmen gelöst. Die Lösung verdünnt man mit 100 ml Wasser. Nach der Behandlung mit 4 ml Harnstofflösung (s.o.) gibt man 800 ml Wasser hinzu und bestrahlt 14 Stdn. bei 0-10° mit UV-Licht. Anschließend wird mit Methylenchlorid aufgearbeitet. Die säure- und wasserfreien Extrakte hinterlassen beim Eindampfen einen bräunlichen Rückstand, der auf Al_2O_3 (sauer, Akt.-St. IV, Elution mit Benzol, Benzol-Chloroform (2:1), (1:1), (1:2)) chromatographiert wird, wobei man fast farblose Kristalle erhält, welche nach Umkristallisation aus Äthanol bei 178-182° schmelzen. Die Ausbeute beträgt etwa 50 % d.Th.

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (75).

4-Hydroxy-oestron: 0,5 g 4-Hydroxy-oestron-3-methyläther werden mit 1,5 g frisch dest. Pyridin-hydrochlorid 20 min. lang auf 210-220° erhitzt. Das erkaltete Gemisch wird mit Wasser ausgekocht, wobei man einen bräunlichen Rückstand erhält, der intensiv mit Wasser gewaschen wird. Das getrocknete Rohprodukt kristallisiert man aus Methanol/Benzol um und erhält farblose Kristalle, welche bei 266-269° unter Zersetzung schmelzen.

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (77). Die Mutterlaugen können auf Silicagel chromatographiert werden. Man eluiert mit Benzol/Chloroform (2:1), (1:1), (1:2). Auf diese Weise erhält man eine weitere geringe Menge 4-Hydroxy-oestron. Die Gesamtausbeute beträgt etwa 80 % d.Th.

2-Hydroxy-oestron: 2-Hydroxy-oestron-3-methyläther wird in der gleichen Weise wie das 4-Isomere behandelt. Man kristallisiert das Rohprodukt zunächst aus sehr wenig Methanol und anschließend aus Benzol um und erhält hellbeige Kristalle vom Schmp. 196-198°.

UV- und IR-Daten sind identisch mit Literaturwerten (77).

2,4-Dinitrophenylhydrazone von 2- und 4-Hydroxy-oestron:
Die orangefarbenen 2,4-Dinitrophenylhydrazone der o-Hydroxy-oestrone erhält man, wenn man deren konzentrierte äthanolische Lösungen in der Wärme mit einer Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in Äthanol/verd. H_2SO_4 (79) versetzt. Sie fallen in kurzer Zeit aus, werden mit Äthanol gewaschen und aus Nitromethan/Benzol (1:1) umkristallisiert. Die 4-Hydroxy-Verbindung schmilzt bei 255° (Zers.), die 2-Hydroxy-Verbindung bei 250° (Zers.); die Schmelzpunkte wurden in zugeschmolzener Kapillare gemessen.

3.) 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β)

Das p-Chinol und sein 2,4-Dinitrophenylhydrazinderivat, das (2,4-Dinitrobenzol)- $\langle 1\text{-azo-3} \rangle\text{-}\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestatrienon-(17)-2,4-dinitrophenylhydrazon, werden nach bekannter Vorschrift (80) dargestellt.

Als Nebenprodukte fielen die beiden o-Chinon-diacetate in geringer Ausbeute an. Das 4,4-Diacetoxy- $\Delta^{1.5(10)}$ -oestadien-dion-(3,17) wurde kristallisiert erhalten und erwies sich in Analyse, Spektren und Schmp. als identisch mit der in der Literatur (80,81) beschriebenen Verbindung.

Das harzige 2-Isomere konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden.

Beide o-Chinon-diacetate wurden in Essigester gelöst und mit Pd-Kohle katalytisch hydriert. Verseifung der auf diese Weise erhaltenen und nicht näher charakterisierten o-Acetoxy-oestrone mit p-Toluolsulfonsäure in Methanol lieferte geringe Mengen 2- und 4-Hydroxy-oestron, welche papierchromatographisch identifiziert wurden.

4.) 2,4-Dinitrophenylhydrazone anderer Hydroxy-oestrone

Die Dinitrophenylhydrazone werden in der gleichen Weise wie die der o-Hydroxy-oestrone (vgl. oben) dargestellt. Sie haben folgende Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte (in zugeschmolzener Kapillare gemessen):

(79) R.L.Shriner, R.C.Fuson, The Systematic Identification of Org.Comp., 3.Aufl., S.171, Wiley u. Sons Inc., New York; Chapman u. Hall, London

(80) E.Hecker u. E.Walk, Chem.Ber. 93, 2928 (1960)

(81) A.M.Gold u. E.Schwenk, J.Amer.Chem.Soc. 80, 5683 (1958)

2,4-Dinitrophenylhydrazon des

1-Hydroxy-oestrone:	260° (Zers.)
6α-Hydroxy-oestrone:	249-250°
16α-Hydroxy-oestrone:	284-286°
16β-Hydroxy-oestrone:	255-256°
6-Oxo-oestrone:	300° (Zers.)
16-Oxo-oestrone:	290° (Zers.)

Zur Reinigung der Derivate vergl. C,4 und C,6.

5.) Dihydrofolsäure

Folsäure wurde nach der Vorschrift von Futterman (82) mit Dithionit zu Dihydrofolsäure reduziert.

Nach neuesten Untersuchungen (83,84) erhält man auf diese Weise das 5,8-Isomere.

6.) Weitere Substanzen

1-, 6α-, 16α-, 16β-Hydroxy-oestron, 17β-Hydroxy-oestrop-chinol-(10β), 1,4-Dihydroxy- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestratrienon-(17), 6- und 16-Oxo-oestron sowie Oestradiol-(17β)-[16-¹⁴C] verdanke ich Herrn Doz. Dr.E. Hecker.

Von der Firma C.F.Boehringer, Tutzing, wurden folgende Substanzen bezogen: NADPH₂ (Na-Salz), NADH₂ (Na-Salz), NADP (Na-Salz), NAD, Meerrettichperoxydase (Susp. in 2,8 m (NH₄)₂SO₄-Lösung, MG ca. 40 000), Rinderleberkatalase (Susp. in Wasser, MG ca. 248 000), Cytochrom c (aus Pferdeherz, MG ca. 16 500), Glucose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (aus Hefe).

Ferner wurde verwendet: Oestron und Oestradiol-(17β) der Fa. Schering, Berlin; p-Chlormercuribenzoessäure (p-CMB) der Fa. Roth, Karlsruhe; o-Phenanthrolin der Fa. Riedel-deHaen, Seelze; α,α'-Dipyridyl, α-Benzoinoxim, Folsäure, Cysteinhydro-

(82) S.Futterman, J.biol.Chemistry 228, 1031 (1957)

(83) S.F.Zakrzewski, Fed.Proc. 22, 231 (1963)

(84) K.Smith, K.G.Scrimgeour, F.M.Huenekens, Biochem. biophys.Res.Comm. 11, 388 (1963)

chlorid und Nicotinamid der Fa. Merck, Darmstadt; Tetrahydrofolsäure (THFS) der Fa. Serva, Heidelberg.

C) Enzymatische Ansätze und ihre Aufarbeitung

1.) Gewinnung von Mikrosomen

Rattenlebermikrosomen werden im wesentlichen nach der Vorschrift von Hecker und Zayed (50) gewonnen. Zu diesem Zweck werden mindestens 3 Monate alte weibliche Wistarratten, welche noch nicht trächtig waren, nach einer 12-stündigen Hungerperiode getötet und entblutet. Die Lebern bringt man in eiskalte isotonische KCl-Lösung. 10%iges Homogenat wird in 0,25 m-Saccharose nach Potter-Elvehjem hergestellt. Darauf zentrifugiert man Erythrozyten, Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien innerhalb von 15 min. bei 15 000 g ab (Spinco L, 15 000 UpM, Rotor Nr. 40). Aus dem Überstand sedimentieren die Mikrosomen bei 105 000 g (40 000 UpM, Rotor Nr. 40) in 45 min. Sie werden mit isoton. KCl gewaschen und in soviel isoton. KCl resuspendiert, daß 1 ml Mikrosomensuspension 1 g Frischleber entspricht.

Die Mikrosomen werden, nachdem sie ohne Zusätze 15 min. lang bei 37° präinkubiert wurden, direkt verwendet.

2.) Zusammenstellung von Inkubationsansätzen

Inkubationsansätze werden, wenn nicht anders vermerkt, bei 0° in folgender Reihenfolge zusammengestellt:

0,4 ml präinkubierte Mikrosomensuspension

0,25 ml 1m-Nicotinsäureamidlösung

0,15m-Phosphatpuffer nach Soerensen, pH 7,4

0,5 ml NADPH₂-Lösung (2 mg/ml Puffer, 1 mg entspr. 1,2 µM)

1,5 ml Oestron-[16-¹⁴C] (10 µg/ml Puffer, 15 µg entspr. 0,056 µM).

Die Puffermenge wird so gewählt, daß ein Endvolumen von 4 ml entsteht. Die Oestron-"Lösung" erhält man, indem man z.B. 200 µg Oestron-(16-¹⁴C) unter Erwärmen in 0,15 ml Äthanol löst und mit 20 ml Puffer verdünnt. Dabei tritt eine schwache Trübung auf, die beseitigt wird, wenn man die "Lösung" auf dem Wasserbad erwärmt. Derartige Oestron-"lösungen" sind auch in der Kälte mehrere Stunden lang stabil; ihr geringer Alkoholgehalt hat keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

Will man den Inkubationsansätzen weitere Zusätze, z.B. Inhibitoren usw. hinzufügen, so löst man diese ebenfalls zuvor in Puffer, schwer lösliche Substanzen in analoger Weise wie Oestron. Alle Konzentrationsangaben von Zusätzen beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das Gesamtvolumen des Ansatzes.

Inkubationsansätze, mit denen die o-Hydroxylierung des Oestrone untersucht werden soll, enthalten als weiteren Zusatz entweder 0,25 ml Tetrahydrofolsäurelösung (1 mg/ml Puffer, 0,25 mg entspr. 0,56 µM) oder anstelle der Mikrosomensuspension eine äquivalente Menge (1,5 ml)^{+) 15 000 g-Überstand, den man aus 20%igem Leberhomogenat in isoton. KCl erhält.}

Arbeitet man statt mit Mikrosomen mit Homogenat, Zellkernen, Mitochondrien oder 105 000 g-Überstand, so wählt man der Mikrosomenfraktion äquivalente Mengen, welche in isoton. KCl suspendiert werden. Um das Endvolumen nicht zu überschreiten, muß man bei Homogenat- und Überstandansätzen von 20%igem Leberhomogenat ausgehen.

Neben dem oben beschriebenen 4 ml-Ansatz wird zuweilen auch ein größerer Ansatz (15 ml) verwendet, den man folgendermaßen zusammenstellt:

^{+) "}Äquivalente" Zellpräparationen sind solche, die aus der gleichen Menge Frischleber wie der standardisierte Mikrosomenansatz gewonnen werden.

- 1,5 ml Mikrosomensuspension
- 1,0 ml 1m-Nicotinsäureamidlösung
- 0,15m-Puffer (auf ein Endvolumen von 15 ml)
- 1,0 ml NADPH₂-Lösung (5 mg/ml Puffer, 6 µM)
- 5,0 ml Oestron- (16-¹⁴C) (10 µg/ml Puffer, 50 µg entspr. 0,19 µM).

Zur Inkubation unter Sauerstoffausschluß wird das in einer Saugflasche angesetzte Gemisch vor der Zugabe von markiertem Oestron zweimal bei 0° evakuiert, wobei man das Vakuum jeweils mit Reinststickstoff, der über einen Cu-Kontakt und durch CrCl₂-Lösung geleitet wurde, aufhebt. Man fügt darauf im N₂-Strom das radioaktive Oestron hinzu, evakuiert noch dreimal wie zuvor und inkubiert anschließend unter Vakuum.

3.) Inkubation und Aufarbeitung

Die wie beschrieben zusammengestellten Ansätze werden im Thermostaten bei 37° 15 min. lang unter Schütteln inkubiert und anschließend im Eisbad mit 1,5 ml 5n-HCl "abgetötet".

Nullzeit-Experimente versetzt man noch bei 0° zu dem Zeitpunkt, bei dem die Inkubation entsprechender Zeitexperimente beginnt, mit 5n-HCl, ohne darauf zu inkubieren.

Eine erste Differenzierung der bei der Inkubation entstandenen Reaktionsprodukte erreicht man, indem man die Ansätze bei 0° dreimal mit je 4 ml peroxydfreiem Äther ausschüttelt. Die Ätherextrakte werden vereinigt, mit Na-Sulfat getrocknet und eingedampft. Falls die Rückstände nicht unmittelbar weiterverarbeitet werden, bewahrt man sie unter Stickstoff bei -30° auf.

Die in den wässrigen Phasen verbliebenen Proteine fällt man mit 4 ml 20%iger Trichloressigsäure und wäscht sie nacheinander mit 4 ml 20%iger Trichloressigsäure, mit 8 ml und zweimal mit 4 ml abs. Äthanol und zweimal mit 8 ml und schließlich mit 4 ml abs. Äther. Das trockene weiße Pro-

teinpulver (etwa 20 mg/ml Mikrosomensuspension bzw. 15000 g-Überstand) wird zur Radioaktivitätsmessung in 80%iger Ameisensäure gelöst (10 mg/ml).

Falls auch die Radioaktivität im wässrigen Rückstand gemessen werden soll, fällt man die Proteine statt mit Trichloressigsäure mit dem gleichen Volumen 0,6n-Perchlorsäure und wäscht den Niederschlag mit Perchlorsäure, Äthanol und Äther. Der Überstand der Proteinfällung wird anschließend bei O° mit 6n-KOH gegen Methylrot neutralisiert, das ausgefällte $KClO_4$ abfiltriert, das Filtrat mit Wasser auf ein definiertes Volumen aufgefüllt und die Radioaktivität aliquoter Teile gemessen. Zur Berücksichtigung der Selbstabsorption ist es notwendig, die Proben trotz der volumetrischen Abmessung auch zu wiegen.

4.) Isolierung von Oestron und 1-Hydroxy-, 2-Hydroxy- und 4-Hydroxy-oestron

Die drei ar-Hydroxy-oestrone können zusammen mit Oestron aus dem gleichen Reaktionsansatz isoliert werden. Zu diesem Zweck versetzt man den Ätherauszug mit je 300 µg der unmarkierten Hydroxy-oestrone und 150 µg Oestron und trennt die vier Verbindungen durch Papierchromatographie im System 1 unter Verwendung von Referenzsubstanz. Die durchschnittlichen R_f -Werte sind:

Oestron	0,68
4-Hydroxy-oestron	0,33
2-Hydroxy-oestron	0,21
1-Hydroxy-oestron	0,08

Nach der Chromatographie setzt man den Eluatn erneut je 5 mg unmarkiertes Hydroxy-oestron bzw. 15 mg Oestron zu, dampft sie im Stickstoffstrom ein und reinigt sie wie folgt:

Oestron: Man kristallisiert zunächst dreimal aus Methanol um und fällt anschließend das Oestron-2,4-dinitrophenylhydrazon. Das Derivat wird dreimal mit 25%igem Äthanol ge-

waschen, getrocknet und darauf dreimal aus Nitromethan/Benzol (1:1) umkristallisiert. Danach ändert sich die spezifische Aktivität weder bei weiterem Umkristallisieren noch nach Chromatographie auf Al_2O_3 (sauer, Akt.St. IV, CHCl_3).

1-Hydroxy-oestron: Man fällt das Dinitrophenylhydrazon, welches zweimal mit 20%igem Äthanol und zweimal mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet wird. Darauf kristallisiert man dreimal aus wässrigem Äthanol um und chromatographiert auf Al_2O_3 (sauer, Akt.St. IV), wobei man mit Chloroform und Chloroform + 10 % Methanol eluiert. Schließlich wird dreimal aus Nitromethan/Benzol (1:1) umkristallisiert. Danach bleibt die Radioaktivität konstant und ändert sich weder bei weiterem Umkristallisieren noch bei Rechromatographie.

2-Hydroxy-oestron: Man fällt das Dinitrophenylhydrazon. Der Niederschlag wird dreimal mit 20%igem Äthanol gewaschen, dreimal aus wässrigem Äthanol umkristallisiert, getrocknet und erneut fünfmal aus Nitromethan/Benzol (1:1) umkristallisiert. Die Radioaktivität ändert sich danach weder bei weiterem Umkristallisieren noch bei Chromatographie auf Kieselgel.

4-Hydroxy-oestron: Das Dinitrophenylhydrazon wird dreimal aus n-Propanol und fünfmal aus Nitromethan/Benzol (1:1) umkristallisiert. Es ändert danach seine spezif. Aktivität auch bei Chromatographie auf Kieselgel nicht mehr.

5.) Isolierung von 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β) und 1,4-Dihydroxy-oestratrien-17-on

17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β) und 1,4-Dihydroxy-oestratrienon können - auch zusammen mit 1- und 4-Hydroxy-oestron und Oestron - aus dem gleichen Ansatz isoliert werden, wenn man den Ätherauszug in System 1 papierchromatographiert. Das p-Chinol läßt sich auf diese Weise jedoch nicht von 2-Hydroxy-oestron trennen.

R_f-Werte in System 1:

17-Oxo-oestra-p-chinol-(10ß)	0,25
1,4-Dihydroxy- $\Delta^{1.3.5(10)}$ - oestratrienon-(17)	0

Vor der Chromatographie setzt man dem Ätherauszug 1,5 mg 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10ß) und 0,1 mg 1,4-Dihydroxy-oestra-trienon zu. Zu den Eluatn fügt man erneut 8,5 mg (oder auch 3,5 mg) Chinol bzw. 5 mg 1,4-Dihydroxy-oestra-trienon. Anschließend reinigt man die Substanzen wie folgt:

17-Oxo-oestra-p-chinol-(10ß): Man löst in Eisessig (4 mg/ml) und versetzt die Lösung bei 50° mit 1 ml Dinitrophenylhydrazinlösung (in Glykolmonomethyläther). Falls sich nach 24 Stdn. (Raumtemp.) kein Niederschlag gebildet hat, engt man etwas ein. Die Azoverbindung wird darauf mit wenig Nitromethan/Benzol (1:1) gewaschen, dreimal aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch umkristallisiert, auf Al₂O₃ (neutral, Akt.St. II) mit Chloroform chromatographiert und erneut zweimal aus Nitromethan/Benzol umkristallisiert. Die spezif. Aktivität ist danach in Kristallisat und Mutterlauge gleich und ändert sich weder bei weiterem Umkristallisieren noch bei Rechromatographie.

1,4-Dihydroxy- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestratrienon-(17): Das Eluat der Papierchromatographie wird zunächst durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel im System Cyclohexan/CHCl₃/Eisessig (3:3:4) weiter gereinigt (R_f etwa 0,5). Darauf fügt man 5 mg Trägersubstanz hinzu und füllt mit Dinitrophenylhydrazin. Das Derivat wird viermal aus n-Propanol/Benzol umkristallisiert und auf Kieselgel (0,05 - 2 mm, 13 % Wasser) mit CHCl₃/Benzol 2:1, 4:1 und CHCl₃ chromatographiert. Darauf kristallisiert man einmal aus Nitromethan/Benzol (1:1) um und erhält ein Präparat von konstanter spezif. Aktivität.

17 β -Hydroxy-oestra-p-chinol-(10 β) wird auf folgende Weise isoliert:

Man versetzt den Ätherauszug des Inkubationsansatzes mit 1,5 mg Trägersubstanz und chromatographiert nacheinander in den Papierchromatographiesystemen 1 und 2. Dem Eluat fügt man weitere 5 mg Trägersubstanz hinzu, dampft ein, löst den Rückstand in Eisessig und fällt mit einer Lösung von Dinitrophenylhydrazin in Glykolmonomethyläther das (2,4-Dinitrobenzol)-<1-azo-3>- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestratrienol-(17 β). Nach 36 Stdn. wird zur Trockne eingedampft und das gesamte Gemisch auf Al_2O_3 (sauer, Akt.St. III) mit Benzol chromatographiert. Anschließend kristallisiert man dreimal aus Aceton um und erhält so ein Produkt von konstanter spezif. Aktivität.

6.) Isolierung von 6- und 16-Hydroxy-oestronen sowie von 6- und 16-Oxo-oestron

6- und 16-hydroxylierte Oestrone und die entsprechenden Oxoverbindungen können zusammen mit 2-Hydroxy-oestron und Oestron aus dem gleichen Reaktionsansatz isoliert werden, wenn man den Ätherauszug nach Zusatz von je 150 μ g Trägersubstanz im System 3 papierchromatographiert. Eine Trennung der epimeren 6- bzw. 16-Hydroxy-oestrone und des 6-Oxo-oestrone vom 16-Oxo-oestron ist dagegen auf diese Weise nicht möglich. Die durchschnittlichen R_F -Werte im System 3 sind:

Oestron	0,85
2-Hydroxy-oestron	0,60
6 α -Hydroxy-oestron	0,28
6-Oxo-oestron	0,70
16 α - und 16 β -Hydroxy-oestron	0,40
16-Oxo-oestron	0,62

Die Eluate der Chromatographie werden je mit weiteren 5 mg "Carrier" versetzt. Darauf überführt man sämtliche Verbindungen (außer Oestron, das nach Zugabe von 20 mg Trägersubstanz zunächst direkt umkristallisiert wird) in die entsprechenden 2,4-Dinitrophenyl-hydrazone, welche anschließend in folgender Weise weiter gereinigt werden:

6 α -Hydroxy-oestron-DNPH: Man kristallisiert viermal aus wäßrigem Dioxan um und chromatographiert auf Al_2O_3 (Akt.-St. IV, sauer) mit Chloroform und Chloroform/Methanol 9:1.

16 α - und 16 β -Hydroxy-oestron-DNPH: Die Verbindungen werden nach viermaligem Umkristallisieren aus wäßrigem Dioxan auf Al_2O_3 (sauer, Akt.-St. IV) mit Chloroform chromatographiert.

6-Oxo-oestron-bis-DNPH: Das sehr schwer lösliche Derivat wird dreimal aus einem wäßrigen Dioxan-Tetrahydrofurangemisch und zweimal aus Dimethylformamid umkristallisiert.

16-Oxo-oestron-bis-DNPH: Man kristallisiert fünfmal aus einem wäßrigen Dioxan-Tetrahydrofuran-Gemisch (1:1) um. Nach diesen Reinigungsoperationen sind die spezifischen Aktivitäten der Derivate konstant und ändern sich bei weiterem Umkristallisieren und Rechromatographieren nicht mehr.

7.) Untersuchung der mikrosomalen NADPH_2 -Oxydation

Die Geschwindigkeit der mikrosomalen NADPH_2 -Oxydation wird verfolgt, indem man das Verschwinden der Absorptionsbande bei 340 m μ mißt.

Die Ansätze werden folgendermaßen zusammengestellt:

- 0,3 ml Mikrosomensuspension in Soerensen-Puffer
vom pH 7,4; entspr. 60 mg Frischleber,
- 0,1 ml 1m-Nicotinamidlösung (0,1 mMol),
- 0,15 m-Phosphatpuffer (nach Soerensen; pH 7,4),
auf ein Endvolumen von 3 ml,
- 0,25 μMol NADPH_2 (0,2 mg/0,2 ml Puffer).

NADPH_2 setzt man unmittelbar vor Beginn der Messung zu. Man mißt stets gegen eine Vergleichsküvette, die außer NADPH_2 alle Bestandteile des Ansatzes enthält.

Weitere Zusätze werden zuvor in Puffer gelöst. Die Versuche werden bei Zimmertemperatur durchgeführt, wobei man in Intervallen von 0,5 min. abliest.

D) Zum Problem der Reproduzierbarkeit
und Signifikanz der Ergebnisse von
"Carrier"-Experimenten

Alle wichtigen Versuche dieser Arbeit sind mindestens einmal, häufig auch mehrmals, reproduziert worden. Nur in eindeutigen Fällen wurde auf eine Wiederholung verzichtet, so z.B. bei zu vorhergehenden Untersuchungen (z.B. 10 β -Hydroxylierung von Oestradiol (50)) analogen Ergebnissen.

Die Reproduzierbarkeit in biochemischen Versuchsanordnungen der beschriebenen Art wird durch eine Reihe schwer kontrollierbarer Faktoren eingeschränkt, von denen Fehler bei der "Enzymeinwaage" (Leberfrischgewicht) und der jeweiligen physiologische Zustand der verwendeten Tiere besonders ins Gewicht fallen.

Man findet daher, daß die Absolutwerte innerhalb verschiedener Versuchsreihen (Enzympräparationen) beträchtlich voneinander abweichen können (bis zu 75 % vom Mittelwert), während die Relationen wesentlich genauer reproduzierbar sind; bei Parallelansätzen beträgt die Streuung dagegen selten mehr als 5-10 %.

Bei Experimenten mit Inhibitoren wird - abgesehen von den Versuchen zur mikrosomalen NADPH₂-Oxydation - meist nur das Ausmaß der Hemmung nach einer bestimmten Inkubationszeit (15 min.) gemessen. Naturgemäß können derartige Werte (prozentuale Hemmung) auch unabhängig von der "natürlichen" Abweichung verschiedener Versuchsreihen relativ stark schwanken (bis 25 % um den Mittelwert).

Spezifische Aktivitäten unter 10 IpM/mg fallen in den Untergrundsbereich des verwendeten Meßgerätes und sind nicht mehr als signifikant anzusprechen; entsprechend müssen Metaboliten, deren Radioaktivität mit fortschreiten der Reinigung unter 0,1 % der als Oestron-(16-¹⁴C) eingesetzten Aktivität absinkt, als nicht entstanden gelten (vgl. z.B. Abschnitt III/E).

III) E r g e b n i s s e

A) Bruttoumwandlung von Oestron durch Rattenleber unter oxydativen Be- dingungen

Bevor die Untersuchung einzelner Stoffwechselreaktionen in Angriff genommen wird, ist es wichtig, sich unter den gleichen Versuchsbedingungen einen Überblick über die Bruttoumwandlung von Oestron in Rattenleber zu verschaffen. Zu diesem Zweck wurde gemessen, wieviel Hormon nach viertelstündiger Inkubation mit Leberhomogenat und verschiedenen Zellfraktionen bei 37° verschwunden ist.

Aus Tab. 1 entnimmt man, daß Homogenat etwa 25 % Oestron "verbrauchen" kann und daß dieser Umsatz durch Zugabe von NADPH₂ mehr als verdoppelt wird, was mit den bekannten Befunden, daß das Gros der oestrogeninaktivierenden Reaktionen NADPH₂ benötigt, übereinstimmt.

Aus diesem Grunde wurde der reduzierte Cofaktor den weiteren Inkubationsansätzen von vornherein zugesetzt.

Tab. 1: Umsatz von Oestron-(16-¹⁴C) durch Rattenleberhomogenat mit und ohne NADPH₂. 4 ml-Ansätze. Eingesetzte Aktivität: 6,3.10⁴ IpM/Ansatz.

Ansatz	NADPH ₂	Spezif. Akt. des DNPH (IpM/mg)	% Oestron- verbrauch
Homogenat	-	1807	25
Homogenat	1,2 µMol	1106	54

(Abkürzungen: IpM = Impulse pro Minute

DNPH = 2,4-Dinitrophenylhydrazon des
Oestrone).

Unter solchen Bedingungen findet man, daß die höchste oestrogenverbrauchende Aktivität der Leberzelle in der Mikrosomenfraktion lokalisiert ist; aber auch Kerne (obwohl gewaschen) und Zellüberstand sind noch relativ wirksam, während Mitochondrien nahezu kein Oestron umsetzen (Abb. 2).

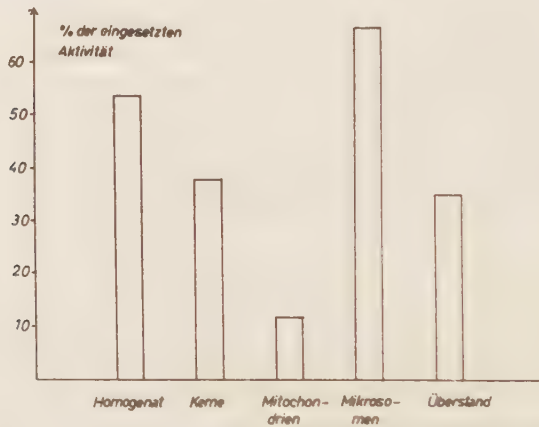


Abb. 2: Umsatz von Oestron-(16-¹⁴C) durch Rattenleberhomogenat und einzelne Zellfraktionen in Gegenwart von 1,2 μ Mol NADPH₂ pro Ansatz. 4 ml-Ansätze.

Der hohe Oestronverbrauch durch die Kernfraktion beruht möglicherweise darauf, daß diese noch mit Erythrozyten - welche ebenso wie Zellüberstand eine 17 β -Dehydrogenase enthalten - "verunreinigt" war; es ist außerdem fraglich, ob sich das endoplasmatische Retikulum vollständig von den Zellkernen trennen läßt.

Den in Abbildung 2 dargestellten Ergebnissen entsprechen die in Tabelle 2 wiedergegebenen Befunden mit den Überständen der jeweiligen Zellfraktionen. Man erkennt, daß Mitochondrien offenbar einen hemmenden Einfluß auf den Oestronstoffwechsel haben, da nach ihrer Entfernung der Substrat-

umsatz deutlich und reproduzierbar ansteigt.

Tab. 2: Umsatz von Oestron-(16-¹⁴C) durch Rattenleberhomogenat und verschiedene Zellfraktionen in Gegenwart von 1,2 μ Mol NADPH₂/Ansatz.
4 ml-Ansätze. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Ansatz	Spezif. Akt. des DNPH (IpM/mg)	% Oestron- verbrauch
Homogenat	1019	58
Homogenat minus Kerne	1225	49
Homogenat minus Kerne und Mitochondrien	706	71
Mikrosomen	686	72
Überstand	1054	56

Die folgende Tabelle zeigt den Oestronumsatz von Mikrosomenpräparationen aus Lebern verschiedener Tiere in Gegenwart von NADPH₂. Aus den Werten errechnet sich ein mittlerer Verbrauch von etwa 65 %; später wird gezeigt, daß der Umsatz unter bestimmten Bedingungen auf 100 % gesteigert werden kann (vgl. III/G,3).

Tab. 3: Umsatz von Oestron-(16-¹⁴C) durch verschiedene Mikrosomenpräparationen in Gegenwart von 1,2 μ Mol NADPH₂ pro Versuch. 4 ml-Ansätze. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM pro Versuch (Inkubationszeit 15 min.)

Versuch Nr.	Spezif. Akt. des DNPH (IpM/mg)	% Oestron- verbrauch
21	48	98
44	1207	50
45	1159	52
47	686	72
48	709	71
49	849	67

Wie ebenfalls an anderer Stelle ausgeführt wird, ist eine der wichtigsten mikrosomalen Inaktivierungsreaktionen des Oestrone, die 2-Hydroxylierung, nur in Gegenwart von Zellüberstand oder Tetrahydrofolsäure (THFS) signifikant nachweisbar. Aus Tab. 4 geht hervor, daß beide Zusätze den Bruttoumsatz des Oestrone hemmen, Überstand wenig, THFS relativ stark; ein noch stärkerer Inhibitor des Oestronverbrauchs ist 2-Hydroxy-oestron selbst.

Tab. 4: Umsatz von Oestron-(16-¹⁴C) unter den Bedingungen der 2-Hydroxylierung. 4 ml-Ansätze mit je 1,2 µMol NADPH₂ und 6,3.10⁴ IpM.

Ansatz	Spezif.Akt.des DNPH (IpM/mg)	% Oestron- verbrauch
Mikrosomen	709	71
Mikrosomen + Überstand	1376	57
Mikrosomen + 0,56 µMol THFS	1467	39
Mikrosomen + 10 ⁻³ m 2-Hydroxy-oestron	1901	21

Die bei kurzzeitiger Inkubation von Oestron-(16-¹⁴C) mit Rattenleber auftretenden Stoffwechselprodukte lassen sich zum größten Teil mit Äther ausschütteln, wobei nur wenig Radioaktivität in der wäßrigen Phase zurückbleibt. Ein nicht geringer Prozentsatz wird außerdem irreversibel an Protein gebunden. Die je nach den Bedingungen unterschiedliche Verteilung ist in Tabelle 5 wiedergegeben.

Man erkennt, daß die Verteilung der Radioaktivität durch Überstand nur wenig beeinflußt wird (geringe Erhöhung in der wäßrigen Phase, leichte Hemmung der Proteinbindung), während THFS die Proteinbindung unterdrückt (vgl. III/B).

Tab. 5: Verteilung der Radioaktivität nach viertelstündiger Inkubation von Oestron-(16-¹⁴C) mit Lebermikrosomen unter verschiedenen Bedingungen.
Pro Ansatz 1,2 μ Mol NADPH₂ und 6,3.10⁴ IpM.

Ansatz	% der eingesetzten Aktivität in		
	Äther	Wasser	Protein
Mikrosomen	79	1,0	13
Mikrosomen + Überstand	86	1,4	11
Mikrosomen + THFS	92	0,9	1

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Rattenleber Oestron in schneller Reaktion chemisch umzuwandeln vermag, wobei ätherlösliche, wasserlösliche und proteingebundene Metaboliten auftreten; der Umsatz wird durch NADPH₂ gesteigert und ist in der Mikrosomenfraktion am höchsten; er wird unter den Bedingungen der Oestron-o-hydroxylierung, also in Gegenwart von Überstand, Tetrahydrofolsäure oder 2-Hydroxy-oestron, vermindert.

B) o-Hydroxylierung am aromatischen Kern
(2- und 4-Hydroxy-oestron) und Protein-
bindung

R.J.B. King (27) hat gezeigt, daß Oestriol durch Rattenleber in 2-Stellung hydroxyliert wird und daß sich die Hydroxylaseaktivität in der Mikrosomenfraktion befindet. Die Reaktion läuft nur in Gegenwart von NADPH₂ und eines Überstandsfaktors, der durch Tetrahydrofolsäure (THFS) ersetzt werden kann, ab.

Dieser Befund kann für Oestron bestätigt werden:

Wie man den Tabellen 6 und 7 entnimmt, vermögen nur Homogenat und die Kombination aus Mikrosomen und 100 000g-Überstand (15 000g-Überstand), aber nicht die einzelnen Zell-

bestandteile, die 2-Hydroxylierung in nennenswertem Maße zu katalysieren.

Die Proteinbindungsreaktion ist dagegen in den Mikrosomen lokalisiert, aber auch die Kernfraktion zeigt einige Aktivität (Tab. 6). Beide Reaktionen werden durch NADPH_2 beträchtlich stimuliert.

Tab. 6: 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron- $(16-^{14}\text{C})$ durch verschiedene Zellbestandteile und Homogenat. 4 ml-Ansätze. Einges. Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Zellfraktion	NADPH_2 (1,2 μM)	Spezif. Akt. des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt. 2-OH-Oe. protein- gebunden	
Homogenat	+	126	1,7	1,7
Homogenat	-	12	0,2	0,5
Kerne	+	8	0,1	2,8
Mitochondrien	+	13	0,2	0,9
Mikrosomen	+	11	0,2	7,5
Mikrosomen	-	5	0,1	0,4
Überstand	+	26	0,3	0,3

Abkürzungen: 2-OH-Oe. = 2-Hydroxy-oestron
2-OH-DNPH = 2,4-Dinitrophenylhydrazon des
2-Hydroxy-oestrone

Tab. 7: 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron- $(16-^{14}\text{C})$ durch verschiedene Zellfraktionen. 4 ml-Ansätze. Einges. Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Zellfraktion	NADPH_2 (1,2 μM)	Spez. Akt. des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt. 2-OH-Oe. protein- gebunden	
Homogenat	+	32	0,4	1,5
Homogenat minus Kerne	+	31	0,4	0,9
15 000g-Überst.)	+	565	7,8	6,9
Mikrosomen	+	10	0,2	12,3
105 000g-Über- stand	+	18	0,2	0,7

+) Homogenat minus Kerne und Mitochondrien

Auffallend ist die relativ geringe Aktivität des Zellhomogenates, die erst nach Abtrennung der Mitochondrien hinaufschneilt (Tab. 7); offenbar wirken diese auf beide Reaktionen hemmend, weil sie NADPH_2 verbrauchen. Diese Vermutung läßt sich beweisen: blockiert man die mitochondriale terminale Oxydase durch 10^{-3}m Cyanid, so werden 2-Hydroxylierung und Proteinbindung im Homogenat erheblich gesteigert, während sie in der Mitochondrienfraktion unverändert bleiben (Tab. 8).

Tab. 8: 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron- $(16\text{-}^{14}\text{C})$ in Homogenat und Mitochondrien; Einfluß von Cyanid. 4 ml-Ansätze mit NADPH_2 . Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Zellfraktion	10^{-3}m - KCN	Spez.Akt.des 2-OH- DNPH (IpM/mg)	% der einges.Akt.	
			2-OH-Oe.	protein- gebunden
Homogenat	-	126	1,7	1,7
Homogenat	+	603	8,3	4,6
Mitochondrien	-	13	0,2	0,9
Mitochondrien	+	19	0,3	0,7

Wie Abb. 3 zeigt, kann man neben der 2-Hydroxylierung auch die Bildung von 4-Hydroxy-oestron, die unter den gleichen Bedingungen stattfindet, nachweisen.

Für beide o-Hydroxylierungen kann der Überstandsfaktor durch THFS ersetzt werden (Abb. 4); dabei wird die Proteinbindung noch wesentlich stärker als durch Überstand gehemmt (Tab. 9). ATP hat im Gegensatz zu den Befunden von King (27) keine aktivierende Wirkung (Abb. 4).

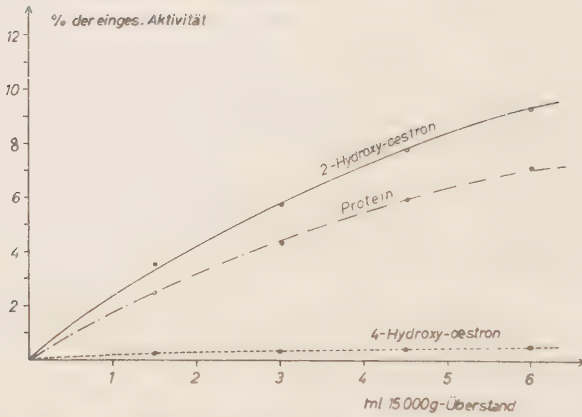


Abb. 3: 2- und 4-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron-(16- ^{14}C) durch Lebermikrosomen + Zellüberstand in Gegenwart von NADPH_2 . 4 ml-Ansätze.

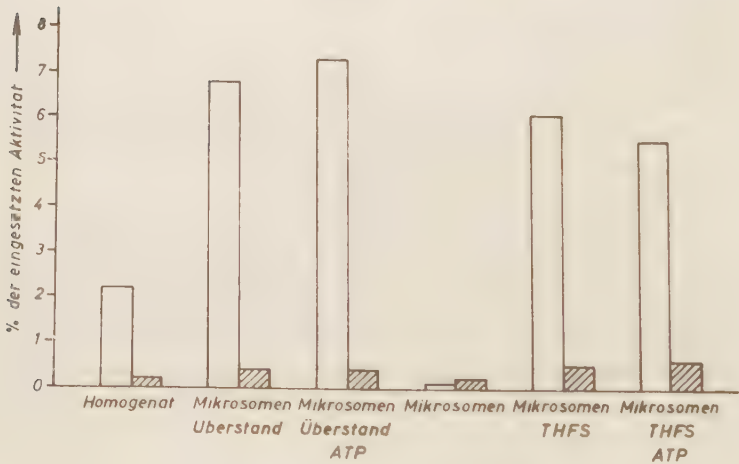


Abb. 4: 2-Hydroxylierung und 4-Hydroxylierung (schraffierte Säulen) von Oestron durch Lebermikrosomen; Stimulierung durch Überstand oder THFS, 4 ml-Ansätze; NADPH_2 .

Tab. 9: Hemmung der mikrosomalen Proteinbindung von Oestron-(16-¹⁴C) durch Zellüberstand und THFS. 4 ml-Ansätze; NADPH₂. Einges.Akt. 6,3.10⁴ IpM/Ansatz.

Ansatz	% der einges. Akt. an Protein gebunden
Mikrosomen	10,7
Mikrosomen + Überstand	7,9
Mikrosomen + THFS	1,1

2-Hydroxy-oestron wird nur in Gegenwart von Sauerstoff gebildet (Tab. 10). Eine "autoxydative" Hydroxylierung durch das System THFS/NADPH₂/O₂ kann ausgeschlossen werden, da praktisch weder im THFS- noch im überstandsabhängigen Inkubationsansatz ohne Mikrosomen 2-Hydroxy-oestron entsteht (Tab. 10).

Tab. 10: Abhängigkeit der o-Hydroxylierung des Oestrone von Sauerstoff und Mikrosomen. 4 ml-Ansätze; NADPH₂. Einges.Akt.: 5,73.10⁴ IpM/Ansatz.

Ansatz	O ₂	Mikros.	Spez.Akt. des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt.
Mikros. + Überstand	+	+	516	7,8
Mikros. + Überstand	-	+	3	0,0
Mikros. + THFS	+	+	442	6,7
THFS	+	-	2	0,0
Überstand	+	-	31	0,5

NADPH₂ ist ein essentieller Cofaktor der o-Hydroxylierung sowohl in Gegenwart von THFS (Tab. 11) als auch mit Überstand (Abb. 5). Auch die Proteinbindung ist - wie schon gezeigt wurde - streng NADPH₂-abhängig.

Tab. 11: Abhängigkeit der 2-Hydroxylierung des Oestrone durch das System Mikrosomen/THFS von NADPH_2 .
4 ml-Ansätze. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Ansatz	NADPH_2 (1,2 μM)	Spez.Akt. des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der ein- ges. Akt.
Mikros. + THFS	+	538	7,4
Mikros. + THFS	-	9	0,1

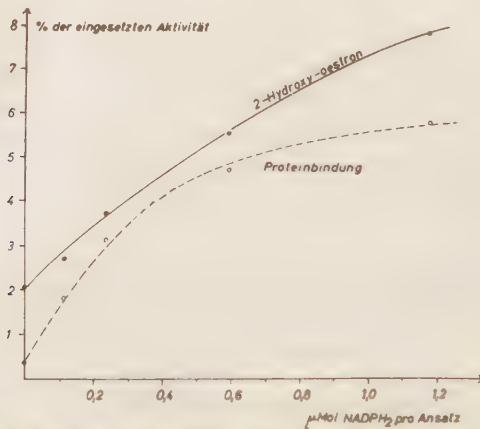


Abb. 5: Bedarf der 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron-(16- ^{14}C) für NADPH_2 im System Lebermikrosomen/Überstand. 4 ml-Ansätze.

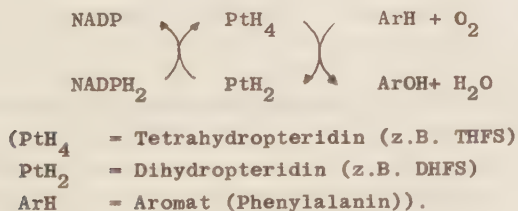
Im THFS-System erreicht NADH_2 nur etwa 50 % der Wirksamkeit von NADPH_2 ; im Überstandshaltigen Ansatz ist es noch weniger aktiv und liegt nur noch wenig über dem "Nullwert", d.h. den Wert, den man ohne Zusatz von Pyridinnukleotiden erhält. Auch Ascorbinsäure kann NADPH_2 nicht ersetzen, sondern hemmt die Reaktion sogar (vgl. Tab. 12); daß NADP und NAD wirkungslos sind, hat schon King (27) festgestellt und wurde hier nicht nochmals bestätigt.

Tab. 12: Wirkung verschiedener Wasserstoffdonatoren auf die 2-Hydroxylierung von Oestron-(16-¹⁴C) in den Systemen Mikrosomen/THFS und Mikrosomen/Überstand. 4 ml-Ansätze. Einges.Akt.: $5,73 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Ansatz	H-Donator (1,2 μ M)	Spez.Akt.des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt. 2-OH-Oe.	pro- tein- geb.
Mikros.+THFS	NADPH ₂	489	7,4	-
Mikros.+THFS	NADH ₂	302	4,1	-
Mikros.+Überst.	NADPH ₂	516	7,8	5,7
Mikros.+Überst.	-	137	2,1	0,4
Mikros.+Überst.	NADH ₂	207	3,1	2,3
Mikros.+Überst.	Ascorbat	3	0,0	0,5

Abhängigkeit der Proteinbindung von verschiedenen Wasserstoffdonatoren siehe auch S. 46.

Nach den bisher beschriebenen Versuchen scheint die Beteiligung von THFS an der Oestronhydroxylierung ein Analogiefall zur Phenylalaninhydroxylase zu sein; bei dieser Reaktion steht das Tetrahydropteridin als vermittelndes Redoxsystem zwischen NADPH₂ und Hydroxylase (O₂): (vgl. S. 70).



Wenn dieses Schema auch für die 2-Hydroxylierung des Oestrone zuträfe, so sollte sich NADPH₂ durch THFS ersetzen lassen. Wie bereits gezeigt wurde und ein weiteres Experiment (Tab. 13) noch einmal deutlich macht, ist dazu jedoch auch ein großer Überschuß von THFS nicht in der Lage. Da es möglich sein könnte,

daß das oxydationsempfindliche Tetrahydropteridin z.B. durch Peroxyde zu schnell zerstört wird, wurde der Versuch in Gegenwart von Katalase wiederholt (dieses Ferment vermag THFS im Falle der Phenylalaninhydroxylierung zu "schützen" ; in einem Kontrollversuch wurde festgestellt, daß Katalase die 2-Hydroxylierung nicht anderweitig hemmt (s.u.). Aber auch derartig "geschützte" THFS kann NADPH_2 nicht ersetzen (Tab. 13). Ebenso führt ein Verzicht auf Präinkubation, bei der Peroxyde akkumulieren könnten, zu keinem positiven Ergebnis (Tab. 13).

Tab. 13: 2-Hydroxylierung von Oestron-(16- ^{14}C) durch Lebermikrosomen: Versuche, NADPH_2 unter verschiedenen Bedingungen durch THFS zu ersetzen. 4 ml-Ansätze. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.					
THFS	NADPH_2	Katalase	Präinkubation	Spez.Akt.2-OH-DNPH (IpM/mg)	% d. einges. Akt.
0,56 μM	1,2 μM	-	+	223	3,5
0,56 μM	1,2 μM	2 m μM	+	266	4,0
0,56 μM	-	-	+	5	0,1
0,56 μM	-	2 m μM	+	4	0,1
0,56 μM	-	-	-	5	0,1
0,56 μM	1,2 μM	-	+	538	7,4
5,6 μM	-	-	+	11	0,2

Gegen das bei der Phenylalaninhydroxylase gültige Schema spricht ferner der in Abb. 6 wiedergegebene Befund, daß THFS in geringen (katalytischen) Konzentrationen auch in Anwesenheit von NADPH_2 die 2-Hydroxylierung des Oestrone nicht unterhalten kann; die Reaktion durchläuft in Abhängigkeit von der THFS-Menge vielmehr eine Art "Induktionsperiode". Der gleiche Versuch zeigt erneut die starke Hemmung der Proteinmarkierung durch das Tetrahydropteridin.

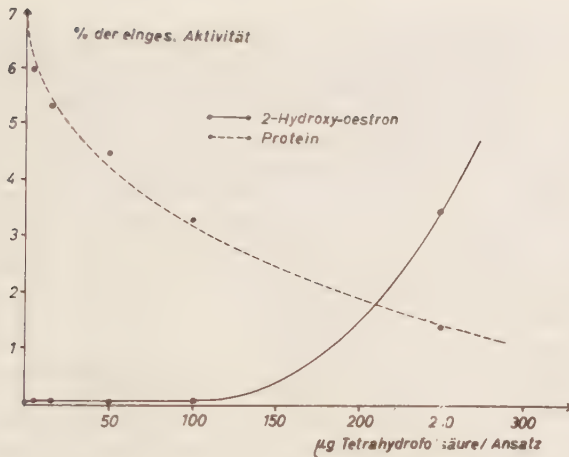


Abb. 6: Proteinbindung (-----) und 2-Hydroxylierung (—) von Oestron-(16- ^{14}C) in Lebermikrosomen: Abhängigkeit von der THFS-Konzentration. 4 ml-Ansätze; 1,2 μM NADPH_2 pro Ansatz.

In einem weiteren Experiment wurde gefunden, daß - unabhängig davon, ob NADPH_2 zugegen ist oder nicht - weder Dihydrofolsäure (DHFS) noch Folsäure in der Lage sind, Tetrahydrofolsäure zu ersetzen (Tab. 14). Auch die Flavinnukleotide FMN und FAD sind wirkungslos, wobei man allerdings berücksichtigen muß, daß sie nur im oxydierten Zustand eingesetzt wurden; an anderer Stelle wird jedoch gezeigt, daß Rattenlebermikrosomen eine NADPH_2 -abhängige Flavinreduktase enthalten (vgl. III/H). Im Gegensatz zu THFS können DHFS und Folsäure die Proteinbindung nicht hemmen; die Flavinoenzyme sind dagegen schwache Inhibitoren (vgl. auch (51)).

Tab. 14: 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron- $(16-^{14}\text{C})$ durch Lebermikrosomen; Versuche, THFS durch andere Stoffe zu ersetzen. 4 ml-Ansätze; $1,2 \mu\text{M NADPH}_2$ pro Ansatz. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Cofaktor	NADPH_2	Spez.Akt.des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges.Akt. 2-OH-Oe	protein-gebunden
THFS	+	236	3,6	1,0
THFS	-	9	0,1	0,2
5,8-DHFS	+	11	0,2	8,1
5,8-DHFS	-	5	0,1	0,3
Folsäure	+	10	0,2	8,8
Folsäure	-	7	0,1	0,4
FAD	+	15	0,2	7,2
FMN	+	16	0,2	6,1

Um die mikrosomale Oestron-o-hydroxylase eingehender zu charakterisieren, wurde der Einfluß verschiedener Inhibitoren untersucht. Zunächst war es von Interesse, die Wirkung des Pteridinantagonisten Aminopterin zu prüfen, der die Phenylalaninhydroxylierung in vivo und in vitro stark hemmt. Wie Tab. 15 zeigt, wirkt er jedoch auf die o-Hydroxylierung des Oestrone eher stimulierend; die Proteinbindung bleibt nahezu unbeeinflusst.

Tab. 15: Wirkung von Aminopterin auf 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron-(16-¹⁴C) in den Systemen Mikrosomen/THFS und Mikrosomen/Überstand. 4 ml-Ansätze; 1,2 μ M NADPH₂. Einges.Akt.: 6,3.10⁴ IpM/Ansatz.

Ansatz	Aminopterin	Spez.Akt. des 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt. 2-OH-Oe., protein- gebunden	
Mikros.+THFS	-	236	3,6	1,0
Mikros.+THFS	2,8.10 ⁻⁴ m	348	5,1	1,1
Mikros.+Übst.	-	230	3,6	4,6
Mikros.+Übst.	2,8.10 ⁻⁴ m	266	4,0	5,4
Mikros.+Übst.	-	388	5,3	6,6
Mikros.+Übst.	10 ⁻³ m	500	6,9	7,0

Die Wirkung weiterer Hemmstoffe ist in Tab. 16 zusammenge- stellt. Wie man sieht, unterdrücken p-Chlormercuribenzoessäure (p-CMB), Ascorbinsäure und 2,4-Dichlorophenol die o-Hydroxy- lierung fast vollständig. Auch Cyanid und Azid sind relativ starke Inhibitoren, während Fluorid und Diäthylthiocarbamat wirkungslos sind. o-Phenanthrolin und α,α' -Dipyridyl stimu- lieren die Reaktion sogar deutlich. Ascorbat und 2,4-Dichloro- phenol hemmen auch die Proteinbindung; weitere Ergebnisse zur Proteinbindung werden später beschrieben, da in den vorliegen- den Ansätzen THFS die Wirkung anderer Inhibitoren überspielt.

Verschiedentlich wurden für die mikrosomalen Hydroxylierun- gen peroxydase-ähnliche Mechanismen gefordert; andererseits kann Peroxydase sowohl Aromaten hydroxylieren als auch Oestro- gene inaktivieren. Es ist daher interessant, die Einwirkung dieses Fermentes und seines Antagonisten Katalase auf die 2- Hydroxylierung des Oestrone zu studieren.

Wie Tab. 17 zeigt, ist in Gegenwart von Meerrettichperoxy- dase so gut wie kein 2-Hydroxy-oestron mehr nachweisbar; Ka- talase hat dagegen keine signifikante Wirkung. Die Beeinflus- sung der Proteinmarkierung durch beide Enzyme wird später be- handelt.

Tab. 16: Einwirkung verschiedener Hemmstoffe auf die 2-Hydroxylierung (und Proteinbindung) von Oestron- $(16-14C)$. 4 ml-Ansätze; $1,2 \mu M$ NADPH₂. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Ansatz	Inhibitor ($10^{-3} m$)	Spez.Akt.2-OH- DNPH(IpM/mg)	%d.einges.Akt. 2-OH-Oe.	protein- gebunden
Mikr.+THFS	-	223	3,5	-
Mikr.+THFS	p-CMB	4	0,1	-
Mikr.+THFS	-	236	3,6	-
Mikr.+THFS	α, α' -Dipyridyl	271	4,1	-
Mikr.+THFS	o-Phenanthrolin	356	5,4	-
Mikr.+THFS	-	538	7,4	-
Mikr.+THFS	2,4-Dichlorophenol	141	1,9	-
Mikr.+THFS	KCN	269	4,0	-
Mikr.+THFS	NaN ₃	240	3,7	-
Mikr.+THFS	NaF	570	7,8	-
Mikr.+THFS	Diäthylthiocarb.	545	7,5	-
Mikr.+Über- stand	-	565	7,8	6,9
Mikr.+Über- stand	2,4-Dichlorophenol	42	0,6	2,8
Mikr.+Über- stand	Ascorbinsäure	33	0,5	4,7

Tab. 17: Einwirkung von Meerrettichperoxydase und Katalase auf die 2-Hydroxylierung des Oestrone. 4 ml-Ansätze; 1,2 μ M NADPH₂. Einges.Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Ansatz	Zusatz	Spez.Akt. 2-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt.
Mikr.+Überstand	-	565	7,8
Mikr.+Überst.	250γ Peroxydase	61	0,1
Mikr.+THFS	-	223	3,5
Mikr.+THFS	250γ Peroxydase	5	0,1
Mikr.+THFS	2m μ M Katalase	266	4,0
Mikr.+THFS	10m μ M Katalase	223	3,5
Mikr.+Überst.	-	388	5,3
Mikr.+Überst.	4m μ M Katalase	332	4,6
Mikr.+THFS	-	538	7,4
Mikr.+THFS	4m μ M Katalase	666	8,3

Zusammenfassend läßt sich sagen:

Die durch ein mikrosomales Enzymsystem der Leber katalysierte o-Hydroxylierung des Oestrone bevorzugt die 2-Stellung; 4-Hydroxy-oestron wird nur wenig gebildet.

Ähnlich wie beim Oestradiol-(17 β) (52) werden 0,1 bis 0,2 % des eingesetzten Substrates in die 2-Hydroxy-Verbindung übergeführt; setzt man dem Mikrosomenansatz jedoch eine äquivalente Menge Überstand oder Tetrahydrofolsäure (0,56 μ M) zu, so kann man durchschnittlich 7 % des eingesetzten Oestrone, also etwa dreißigmal mehr, als 2-Hydroxy-oestron isolieren. THFS hat auf die o-Hydroxylierung des Oestrone einen anderen Einfluß als auf die bekannte p-Hydroxylierung des Phenylalanins (vgl. S. 70).

Die Proteinbindung beträgt im Mikrosomenansatz im Mittel etwa 11 % (vgl. auch Abschnitt III/C) und wird durch Über-

stand auf durchschnittlich 6-7 %, durch THFS auf 1-2 % der eingesetzten Substratmenge gesenkt.

Hydroxylierung und Proteinbindung erfordern Sauerstoff und große Mengen NADPH_2 , welches durch NADH_2 nur teilweise ersetzt werden kann. Das Enzymsystem enthält essentielles Metall und aktive Sulphydrylgruppen.

C) p-Hydroxylierung (17-Oxo-oestra-
p-chinol-(10 β)) und Proteinbindung

Wie man aus den Arbeiten von Hecker et al. (49 - 51,53) weiß, ist die 10 β -Hydroxylierung ein deutlich nachweisbarer Stoffwechselweg des Oestradiols-(17 β) in Rattenleber. Die theoretisch interessante sauerstoffabhängige Reaktion wird durch ein mikrosomales Enzym katalysiert (51) und durch NADPH_2 aktiviert (50).

Auch Oestron wird unter den gleichen Bedingungen in das entsprechende p-Chinol übergeführt; daneben läuft die schon bekannte Proteinbindung ab, die - wie zuvor gezeigt wurde - ebenfalls in Mikrosomen lokalisiert ist. Beide Reaktionen kommen weitgehend zum Erliegen, wenn man das "Enzym" vor der Inkubation 15 min. lang auf 80-100° erhitzt (Tab. 18). Diese Hitzeinaktivierung ist jedoch im Falle der p-Hydroxylierung nicht immer erfolgreich, sondern kann in Einzelfällen sogar zu einer Steigerung der Ausbeute an p-Chinol führen, ein Phänomen, dessen Deutung später gegeben wird. Ebenso wie die o-Hydroxylierung sind auch p-Hydroxylierung und Proteinbindung an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden (Tab. 18).

Tab. 18: Abhängigkeit der p-Hydroxylierung und Proteinbindung des Oestrans von Lebermikrosomen und Sauerstoff. 15 ml-Ansätze; 10 mg "Carrier"; 6 μ M NADPH₂/Ansatz. Einges.Akt.: $1,91 \cdot 10^5$ IpM/Ansatz.

Mikrosomen	O ₂	Spez.Akt.der Azoverb. (IpM/mg)	% d.einges.Akt. p-Chinol	protein-gebunden
+	+	230	2,7	7,8
-	+	1	0,0	-
+	-	26	0,3	0,4
+ (erhitzt)	+	68	0,8	0,2

(Azoverb. = 2,4-Dinitrophenylhydrazon des (2,4-Dinitrobenzol)- $\langle 1\text{-azo-3} \rangle$ - $\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestratrienons-(17);

p-Chinol = 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β)).

Beide Reaktionen hängen - wie Abb. 7 zeigt - auch von NADPH₂ ab:

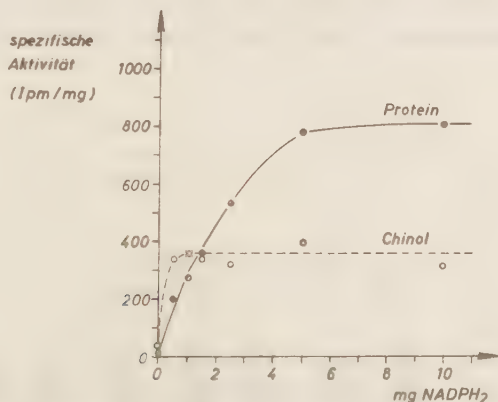


Abb. 7: NADPH₂-Abhängigkeit von Proteinbindung und p-Hydroxylierung des Oestrans in Lebermikrosomen. 15 ml-Ansätze 10 mg "Carrier".

Auffallend ist jedoch, daß die p-Hydroxylierung im Gegensatz zur o-Hydroxylierung und Proteinbindung nur sehr wenig NADPH₂ erfordert; in mehr als 50 % aller Versuche läuft sie sogar ohne Zusatz des Cofaktors ab (Tab. 19).

Tab. 19: NADPH₂-Abhängigkeit von p-Hydroxylierung und Proteinbindung des Oestrans-(16-¹⁴C) in Lebermikrosomen, 15 ml-Ansätze; 10 mg "Carrier". Einges. Akt.: $1,91 \cdot 10^5$ IpM/Ansatz.

Versuch	NADPH ₂	Spezif. Akt. der Azoverb. (IpM/mg)	% der einges. Akt.	
			p-Chinol	proteingeb.
1	6 μ M	102	1,2	6,7
	-	133	1,5	0,7
2	6 μ M	190	2,2	11,7
	-	24	0,3	0,2
3	6 μ M	307	3,5	11,8
	-	343	4,0	0,2
4	1,8 μ M	152	1,8	6,6
	-	142	1,6	0,4
5	1,2 μ M	180	2,1	-
	-	11	0,1	-

Dieses eigenartige Verhalten der Reaktion äußert sich auch darin, daß andere Pyridinnukleotide das gleiche Ergebnis liefern wie Ansätze mit (oder ohne) NADPH₂ (Abb. 8).

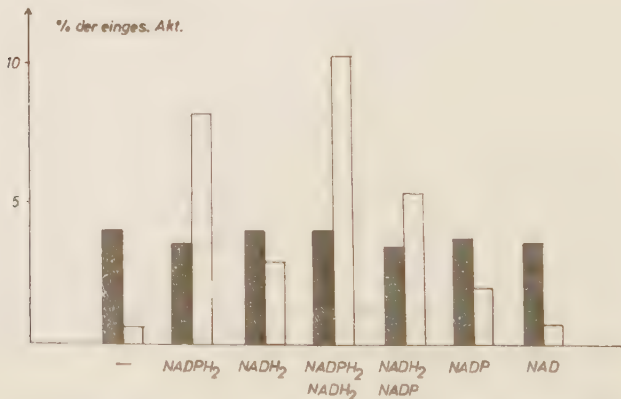


Abb. 8: Proteinbindung (leere Säulen) und p-Hydroxylierung (schwarze Säulen) in Abhängigkeit von verschiedenen Pyridinnukleotiden (6 μ M/Ansatz). Die Werte der Proteinbindung sind aus zwei Versuchen gemittelt. 15 ml-Ansätze; 10 mg "Carrier".

Die Proteinbindung verhält sich dagegen auch hier wie die o-Hydroxylierung (S. 36): NADPH_2 ist etwa dreimal wirksamer als NADH_2 , die Effekte beider Cofaktoren scheinen sich zu addieren; NAD und NADP können die Reaktion fast nicht unterhalten, mit der Kombination aus NADP und NADH_2 erzielt man jedoch eine höhere Proteinmarkierung als mit NADH_2 allein (Abb. 8).

Zellüberstand und THFS - die "Cofaktoren" der o-Hydroxylierung - hemmen die p-Hydroxylierung vollständig (Abb. 9; eine Wiederholung des Versuches ergab 60%ige Hemmung durch Überstand und 80%ige Hemmung durch THFS); die Proteinbindung wird ebenfalls unterdrückt (vgl. III/B).

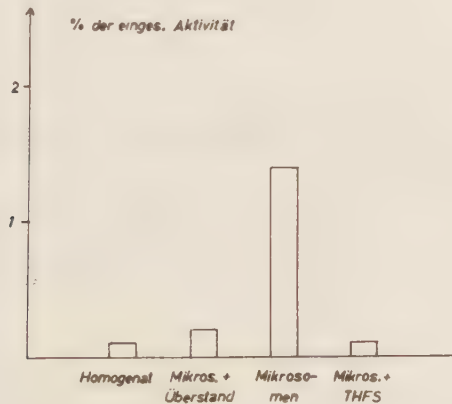


Abb. 9: Hemmung der p-Hydroxylierung von Oestron durch Zellüberstand und Tetrahydrofolsäure ($0,56 \mu\text{M}$ /Ansatz). 15 ml-Ansätze; $6 \mu\text{M}$ NADPH_2 /Ansatz.

Versuche mit Inhibitoren liefern weiteres Material zur Unterscheidung von o-Hydroxylierung, p-Hydroxylierung und Proteinbindung. Zwar werden alle drei Reaktionen durch p-CMB,

Cyanid und 2,4-Dichlorophenol etwa im gleichen Maße hemmt, während z.B. Fluorid in allen drei Fällen wirkungslos ist, dagegen unterdrücken o-Phenanthrolin und wesentlich stärker α, α' -Dipyridyl nur die p-Hydroxylierung, während sie die Proteinmarkierung in der gleichen Weise wie die o-Hydroxylierung stimulieren; Ascorbinsäure wiederum hemmt nur o-Hydroxylierung und Proteinbindung; ähnlich wirken Cytochrom c und Cystein (an der o-Hydroxylierung nicht getestet). α -Benzoinoxim beeinträchtigt p-Hydroxylierung und Proteinmarkierung, sein Einfluß auf die o-Hydroxylierung wurde nicht untersucht. Interessant ist, daß 2-Hydroxy-oestron für Proteinbindung und Chinolbildung zu den stärksten Inhibitoren zählt.

Tab. 20 ist eine Zusammenstellung der wichtigsten Hemmversuche; die Werte für die 2-Hydroxylierung wurden mit aufgenommen; auf die Angabe spezifischer Aktivitäten wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Tab. 20: Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf o-Hydroxylierung, p-Hydroxylierung und Proteinbindung des Oestrone.

Inhibitor	Konz.	Prozentuale Hemmung der		
		p-Hydrox.	o-Hydrox.	Proteinbindung
p-CMB	10^{-3}_m	95	95	95
KCN	10^{-3}_m	40	50	40
NaF	10^{-3}_m	12	0	10
o-Phenanthrolin	10^{-3}_m	30	40% Akt. ⁺⁾	40% Akt.
α, α' -Dipyridyl	10^{-3}_m	60-90	15% Akt.	10% Akt.
α -Benzoinoxim	10^{-3}_m	38	-	40
2,4-Dichloroph.	10^{-3}_m	93	75	75
2-Hydroxy-oestron	10^{-3}_m	100	-	98
Ascorbinsäure	10^{-3}_m	10	80	70
Cytochrom c	$3 \cdot 10^{-7}_m$	0	-	50
Cystein.HCl	10^{-3}_m	20	-	60

⁺⁾ Akt. = Aktivierung

Ganz anders als die 2-Hydroxylierung verhalten sich Proteinbindung und 10 β -Hydroxylierung gegenüber Peroxydase: beide Reaktionen werden durch dieses Enzym stark stimuliert (Abb. 10):

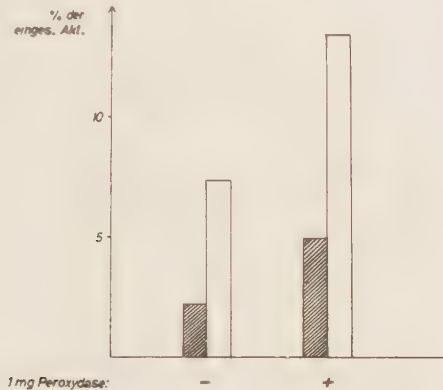


Abb. 10: Beeinflussung von p-Hydroxylierung (schraffierte Säulen) und Proteinbindung (leere Säulen) des Oestrone in Lebermikrosomen durch Meerrettichperoxydase. 15 ml-Ansätze; 6 μ M NADPH₂/Ansatz.

Katalase, welche die o-Hydroxylierung nicht beeinflusste, hemmt p-Hydroxylierung und Proteinbindung in hoher Konzentration stark (Abb. 11).

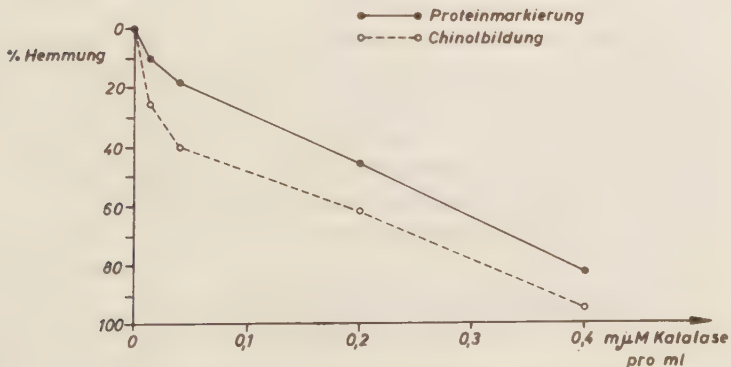


Abb. 11: Hemmung von Proteinbindung und p-Hydroxylierung des Oestrone in Mikrosomen durch Katalase. 15 ml-Ansätze; 6 μ M NADPH₂/Ansatz.

Außer in den bisher betrachteten Experimenten unterscheiden sich Proteinbindung und p-Hydroxylierung nicht zuletzt hinsichtlich ihrer Geschwindigkeit signifikant. Abb. 12 zeigt, daß p-Chinol auch bei 10^0 noch relativ schnell gebildet wird, während die Proteinbindung nur noch sehr träge abläuft. Überraschend ist das schnelle Abklingen der p-Hydroxylierung und ihr hoher Nullwert (vgl. auch (50)).

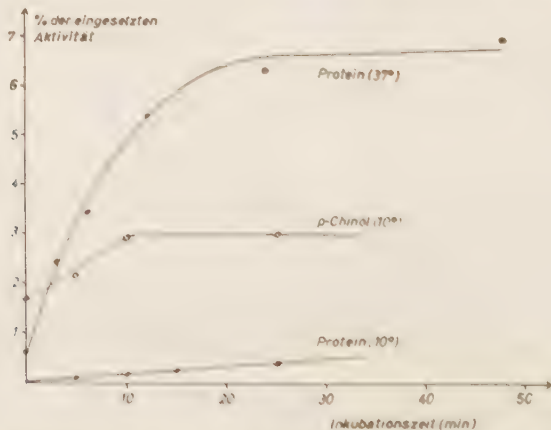


Abb. 12: Geschwindigkeit von Proteinbindung und p-Hydroxylierung des Oestrone in Lebermikrosomen bei 10^0 (und 37^0). 15 ml-Ansätze; $6 \mu\text{M}$ NADPH₂ Ansatz.

Abschließend wurden Proteinbindung und p-Hydroxylierung von Oestron und Oestradiol-(17 β) miteinander verglichen. Es ergab sich, daß im gleichen Mikrosomenansatz die p-Hydroxylierung des Oestrone gegenüber der des Oestradiols wesentlich bevorzugt ist, während Oestradiol hinsichtlich der Proteinbindung dominiert; aus Inkubationsansätzen mit Oestradiol-(17 β) läßt sich nur wenig 17-Oxo-oestra-p-chinol, aus Ansätzen mit Oestron praktisch kein 17 β -Hydroxy-oestra-p-chinol isolieren (vgl. Tab. 21 und Abb. 13).

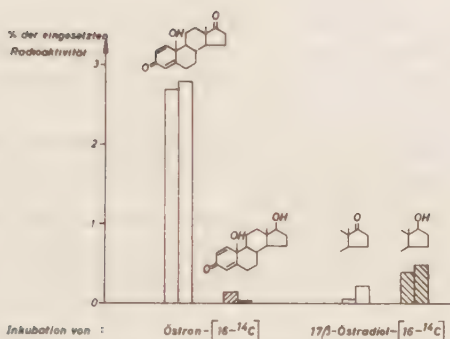


Abb. 13: Wechselseitige Chinolbildung aus Oestron und Oestradiol-(17β) in Lebermikrosomen. 15 ml-Ansätze; 6 μM NADPH_2 /Ansatz. 2 Versuche.

Tab. 21: Vergleich der Proteinmarkierungen durch Oestron-(16- ^{14}C) und 17β-Oestradiol-(16- ^{14}C) in gleichen Mikrosomenpräparationen. 15 ml-Ansätze; 6 μM NADPH_2 /Ansatz. Einges.Akt. s.u.

Inkubation von	Totale Akt. des Proteins (IpM)	% der einges.Akt.an Protein gebunden
Oestron	17 700	9,3
Oestradiol-(17β)	22 480	12,3
Oestron	25 940	13,6
Oestradiol-(17β)	38 450	21,0

Einges.Akt.: $1,91 \cdot 10^5$ IpM Oestron-(16- ^{14}C)
 $1,83 \cdot 10^5$ IpM 17β-Oestradiol-(16- ^{14}C)
 pro Ansatz.

Trotz der großen Streuung der Absolutwerte erkennt man, daß die Proteinbindung für Oestradiol stärker ausgeprägt ist als für Oestron.

Im folgenden sei das Ergebnis dieses Abschnittes kurz zusammengefaßt:

Wie Tabelle 22 zeigt, schwanken die Ausbeuten der p-Hydroxylierung und der Proteinbindung stark, wenn man Experimente mit Mikrosomenpräparationen verschiedener Tiere miteinander vergleicht.

Tab. 22: 10 β -Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron-(16-¹⁴C) in Rattenlebermikrosomen. 15 ml-Ansätze; 6 μ M NADPH₂ pro Ansatz; 10 mg Carrier. Einges.Akt. 1,91.10⁵ IpM/Ansatz.

Versuch	Spezif.Akt.der Azoverb.(IpM/mg)	Totale Akt. d.Proteins (IpM)	% der einges. Akt. p-Chinol	an Protein
1	152	-	1,8	-
2	102	12 800	1,2	6,7
3	190	22 400	2,2	11,7
4	230	-	2,7	-
5	240	19 825	2,8	10,5
6	307	22 400	3,5	11,7
7	180	13 560	2,1	7,2
8	363	22 360	4,2	11,7
9	232	25 900	2,7	13,6
10	120	24 670	1,4	13,0

Durchschnittlich erhält man nach viertelstdg. Inkubation

2,5 % der einges.Akt. als 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β)

11 % der einges.Akt. an Protein gebunden.

Die p-Hydroxylierung ist beim Oestron stärker ausgeprägt als beim Oestradiol-(17 β) und unterscheidet sich von der o-Hydroxylierung bzw. Proteinbindung signifikant in ihrer Geschwindigkeit, ihrem Bedarf für NADPH₂ und ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Hemmstoffen. besonders auffallend ist die bei der o-Hydroxylierung nicht beobachtete Hemmung von p-Hydroxylierung und Proteinbindung durch hohe Katalasekonzentrationen und die Aktivierung beider Reaktionen durch Peroxydase.

D) Versuche zum Nachweis einer m-Hydroxy-
lierung (1-Hydroxy-oestron)

Aus theoretischen Gründen ist die Frage, ob neben o- und p-Hydroxylierung auch eine m-Hydroxylierung des Oestrone beobachtet werden kann, von Interesse.

Ein entsprechender Versuch, der vorerst nur als Orientierung zu werten ist, zeigt eindeutig, daß sowohl Rattenlebermikrosomen allein als auch ihre Kombination mit Zellüberstand, wenn überhaupt, dann nur wenig Oestron in Position 1 hydroxylieren können.

Mit den in Abschnitt II,C beschriebenen Inkubations-, Isolierungs- und Reinigungsmethoden erhält man die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Werte:

Tab. 23: Bildung von 1-Hydroxy-oestron aus Oestron-(16-¹⁴C) durch Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von 1,2 µM NADPH₂ pro Ansatz (4 ml). 5,2 mg "Carrier". Einges. Akt.: $26,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz.

Ansatz	Spezif. Akt. des 1-OH-DNPH (IpM/mg)	% der einges. Akt.
Mikrosomen	29	0,4
Mikr.+Überstand	23	0,3

Eine Wiederholung des Versuches ergab Werte in der gleichen niedrigen Größenordnung (0,2 bis 0,3 %).

E) Versuche zum Nachweis einer Dienon-Phenol-
Umlagerung von 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β)

Hecker et al. (50) diskutierten im Anschluß an die p-Hydroxylierung der Oestrogene eintretende Folgereaktionen, die zu einer Umwandlung des entstandenen p-Chinols führen könnten. Als solche kämen in erster Linie Dienon-Phenol-Umlagerungen in Betracht, wie sie auch für den Verlauf der Reaktion p-Hydroxyphenyl-brenztraubensäure $\longrightarrow$ Homogentisinsäure diskutiert werden. Aus 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β) würde auf analoge Weise 1,4-Dihydroxy- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestratrienon-(17) entstehen. Diese Verbindung läßt sich jedoch unter den in Kapitel II,C beschriebenen Versuchsbedingungen praktisch nicht nachweisen. Tab. 24 zeigt den Abfall der spezifischen Aktivitäten der Dinitrophenylhydrazone aus zwei verschiedenen Ansätzen mit fortschreitender Reinigung:

Tab. 24: Bildung von 1,4-Dihydroxy- $\Delta^{1.3.5(10)}$ -oestra-trienon-(17) aus Oestron-(16-¹⁴C) durch Rattenlebermikrosomen in Gegenwart von 1,2 μ M NADPH₂/4 ml-Ansatz. 5,1 mg "Carrier". Einges.Akt.: 6,3.10⁴ IpM/Ansatz. Spezif.Akt. der Dinitrophenylhydrazone in IpM/mg.

Reinigungsschritt	Mikros.	Mikr.+Überstand
Vorgereinigt, als DNPH gefällt, 4-mal aus n-Propanol/Benzol umkristallisiert	92	13
Chrom. auf Kieselgel	18	5
1-mal aus Nitromethan-Benzol umkristallisiert	12 (0,1%)	3 (0,0%)

F) Hydroxylierungen in aliphatischen Positionen (6- und 16-Hydroxy-oestron sowie mögliche Folgeprodukte)

Es ist bekannt (25), daß Oestrogene durch Lebermikrosomen in den Positionen 6 und 16 hydroxyliert werden. Ein quantitativer Vergleich dieser Reaktionen miteinander und mit der aromatischen Hydroxylierung wurde jedoch bisher nicht beschrieben, ist aber im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse. Es wurde daher untersucht, wieviel 6 α -, 16 α - und 16 β -Hydroxy-oestron unter den gleichen Bedingungen, wie sie für die Untersuchung der 1-, 2-, 4- und 10 β -Hydroxylierung gewählt wurden, entsteht.

Abb. 14 zeigt das Ergebnis eines entsprechenden Versuches:

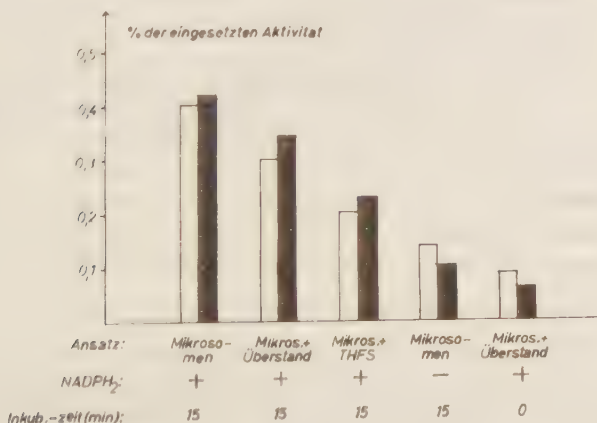


Abb. 14: 6 α -Hydroxylierung (leere Säulen) und 16 α -Hydroxylierung (schwarze Säulen) von Oestron. Pro Ansatz 1,2 Mol NADPH₂ und 6,3.10⁻⁴ IpM.

Die Ausbeute an 16 β -Hydroxy-oestron beträgt weniger als 0,1 %. Der Versuch reproduziert die einleitend erwähnte Tatsache, daß auch die aliphatischen Hydroxylierungen der Oestrogene NADPH₂ benötigen. Der Unterschied zwischen den Hydroxylierungen durch Mikrosomen und durch Mikrosomen und Überstand dürfte kaum signifikant sein, THFS scheint jedoch zu hemmen.

Wie die 16 β -Hydroxylierung spielt auch die 6 β -Hydroxylierung nur eine ganz untergeordnete Rolle (etwa 20 % der 6 α -Hydroxylierung (39)) und wurde deshalb nicht gemessen.

Auch absolut sind die Ausbeuten der α -Isomeren überraschend niedrig, so daß die Vermutung naheliegt, daß schnelle Folgereaktionen die primären Metaboliten verbrauchen. In der Tat kann ein relativ hoher Prozentsatz 6-Oxo-oestron nachgewiesen werden; 16-Oxo-oestron findet man dagegen nur sehr wenig (vgl. Kap. III/G).

Tab. 25: Bildung von 6-Oxo-oestron aus Oestron-(16-¹⁴C) unter verschiedenen Bedingungen. 1,2 μ Mol NADPH₂ und 6,3.10⁴ IpM pro Ansatz.

Ansatz	NADPH ₂	Inkub.Zeit (min)	Spez.Akt.des Bis-DNPH (IpM/mg)	% der ein- ges. Akt.
Mikrosomen	+	15	187	3,7
Mikr./überst.	+	15	193	3,8
Mikrosomen	-	15	70	1,4
Mikr./überst.	+	0	10	0,2

Die in Abb. 14 und Tab. 25 wiedergegebenen Resultate wurden mit der gleichen enzymatischen Préparation erzielt, sind also unmittelbar vergleichbar. Der Oestronverbrauch betrug sowohl mit Mikrosomen als auch mit Mikrosomen + Überstand rund 45 %, die Proteinbindung 12,2 % (Mikrosomen) bzw. 7,5 % (Mikrosomen + Überstand).

G) Vergleichende kinetische Untersuchungen
von aliphatischer und aromatischer Hydroxy-
lierung, Proteinbindung und Bruttometaboli-
sierung des Oestrone

1.) Aliphatische Hydroxylierung

Die im vorigen Abschnitt (Kap. III/F) beschriebenen Experimente haben es wahrscheinlich gemacht, daß sowohl 6- als auch 16-hydroxylierte Oestrone durch schnelle Folgereaktionen verbraucht werden. 6-Oxo-oestron, ein Sekundärprodukt der 6-Hydroxylierung, konnte direkt nachgewiesen werden. Kinetische Messungen zeigen, daß auch 16 α -Hydroxy- und sogar 16-Oxo-oestron nach kurzer Bildungsphase wieder weitgehend aus dem enzymatischen Ansatz verschwinden (Abb. 15); die Ausbeute an 6 α -Hydroxy-oestron erreicht dagegen, zumindest im Mikrosomensystem, nach etwa 20 min. einen konstanten Wert (Abb. 15).

Die Kurven zeigen, daß mit Mikrosomen allein nicht nur die 6-Hydroxylierung sondern auch die 16-Hydroxy- und 16-Oxo-oestron verbrauchenden Folgereaktionen nach etwa 20 min. zum Stillstand kommen, während bei Zusatz von Überstand 16 α -Hydroxy-oestron zwar etwas langsamer gebildet wird, aber auch über einen längeren Zeitraum hin weiterreagiert; ähnliche Ergebnisse findet man für Proteinbindung und Oestronverbrauch (s.u.).

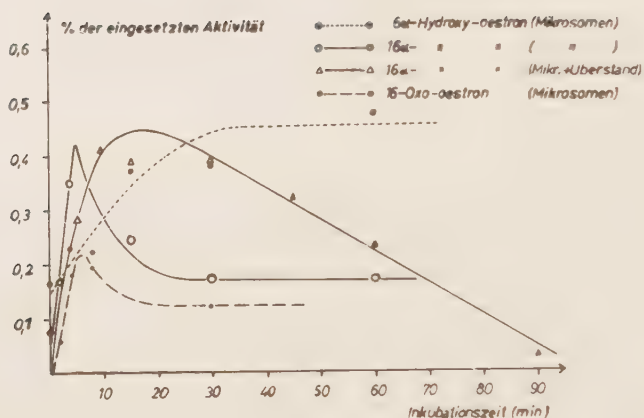


Abb. 15: Kinetik der Bildung von 6α-Hydroxy-oestron (.....●.....), 16α-Hydroxy-oestron (—○—) und 16-Oxo-oestron (---○---) mit Mikrosomen sowie von 16α-Hydroxy-oestron (—△—) mit Mikrosomen + Überstand. Pro Ansatz 1,8 μM NADPH₂ und 6,3 · 10⁴ IpM als Oestron-(16-¹⁴C).

2.) 2-Hydroxylierung und Proteinbindung

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß zwischen Proteinbindung und 2-Hydroxylierung ein enger mechanistischer Zusammenhang besteht; möglicherweise wird ein Folgeprodukt des 2-Hydroxy-oestrone an Protein gebunden.

Tatsächlich durchläuft die Kinetik der o-Hydroxylierung ein ausgeprägtes Maximum, während die Proteinbindung nach einer kurzen und reproduzierbaren "Anlaufzeit" linear ansteigt (Abb. 16). Die Anfangsgeschwindigkeit der 2-Hydroxylierung ist der Geschwindigkeit der Proteinbindung (im linearen Teil) nahezu gleich.

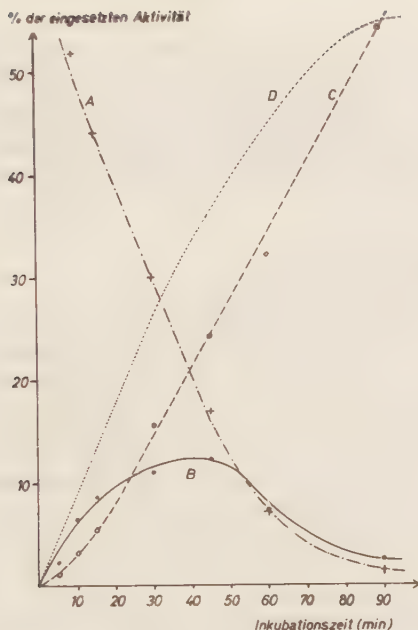


Abb. 16: Oestronverbrauch (---A), 2-Hydroxylierung (—B) und Proteinbindung (----C) durch Mikrosomen + Überstand in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. $1,8 \mu\text{M}$ NADPH_2 pro Ansatz. Einges. Akt.: $6,3 \cdot 10^4$ IpM/Ansatz. Kurve D: Hypothetische Bildungskurve von 2-Hydroxy-oestron.

Wie zu erwarten, läuft die 2-Hydroxy-oestron verbrauchende Reaktion der Bildungsreaktion erst dann den Rang ab, wenn nur noch wenig Ausgangsprodukt (Oestron) vorhanden ist. Die Proteinbindung steigt jedoch auch nach fast vollständigem Oestronverbrauch noch linear an, womit ihr Charakter als Folgereaktion gesichert ist. Unter der Annahme, daß zumindest im frühen Stadium der Oestronmetabolisierung nur 2-Hydroxy-oestron Vorläufer der Proteinbindung ist, läßt sich durch Addition der Kurven B und C (Abb. 16) eine Kurve D konstruieren, welche die Bildungsgeschwindigkeit des 2-Hydroxy-oestrone widerspiegeln sollte. Ihr Anstieg ist zunächst linear.

Da die Kurve D, deren oberer Teil durch Spiegelung an der Oestronverbrauchskurve A erhalten wurde, von der Proteinbindungskurve C geschnitten wird, liegt die Vermutung nahe, daß im späteren Stadium der Reaktion außer 2-Hydroxy-oestron noch andere 2-hydroxylierte Metaboliten zur Proteinbindung führen.

3.) Die Wirkung des Überstandes

Der in Abbildung 16 dargestellte Versuch zeigt, daß die Proteinbindung im kombinierten System Mikrosomen + Überstand auch nach 20 min. noch unvermindert ansteigt, während sie mit Mikrosomen allein nach der gleichen Zeit bereits zum Stillstand gekommen ist (vgl. Abb. 12). Ähnliches gilt, wie gezeigt wurde, auch für die Bildungs- und Folgereaktionen der 6- und 16-hydroxylierten Metaboliten, aber auch für die Bruttometabolisierung des Oestrone (Abb. 17).

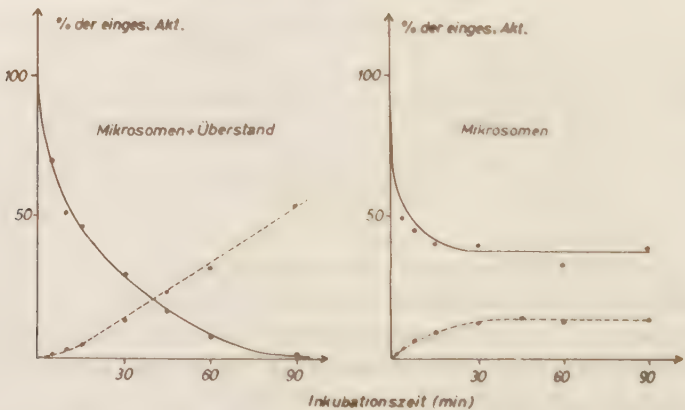


Abb. 17: Oestronverbrauch (—) und Proteinbindung (----) durch Mikrosomen und Mikrosomen + Überstand. $1,8 \mu\text{M NADPH}_2$ und $6,3 \cdot 10^4$ IpM pro Ansatz. 37° .

Auf der Suche nach der Ursache dieses "Mikrosomeneffektes" (vgl. (49)) zeigte es sich, daß offenbar das als Puffer verwendete Phosphat für den Abbruch der Reaktionen nach 20 min.

verantwortlich ist; inkubiert man nämlich mit Mikrosomen in Trispuffer, so findet auch nach 1,5 Stunden noch Proteinbindung statt; ein NADPH_2 -regenerierendes System kann diesen Effekt etwas verstärken (Abb. 18).

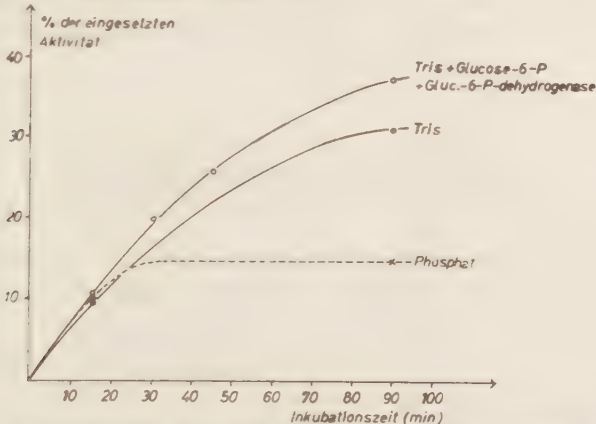


Abb. 18: Proteinbindung durch Mikrosomen in Gegenwart von Phosphatpuffer (0,6 mM/Ansatz) und Trispuffer (0,4 mM/Ansatz) sowie Trispuffer und Glucose-6-phosphat (5,4 μM /Ansatz) + Glucose-6-phosphatdehydrogenase (100 μg /Ansatz). 1,8 μM NADPH_2 und $6,3 \cdot 10^{-4}$ IpM/Ansatz.

Während der Inkubation mit dem System Mikrosomen + Überstand werden praktisch das gesamte Oestron und seine ätherlöslichen Primärmetaboliten in proteingebundene und wasserlösliche Produkte umgewandelt (Abb. 19). Daneben tritt ein relativ hoher bisher ungeklärter Verlust an Radioaktivität ein, d.h. die Summe der Aktivitäten in Äther-, Wasser- und Proteinfraktion weicht im Verlauf der Metabolisierung mehr und mehr von 100 % ab (Abb. 19 und (85)).

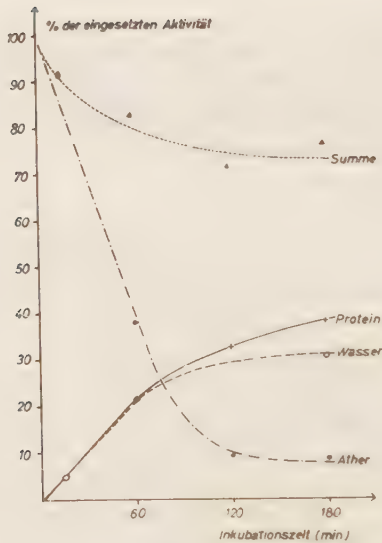


Abb. 19⁺): Umwandlung des Oestrone und seiner Primärmetaboliten in wasserlösliche (---) und protein-gebundene (—) Folgeprodukte. Die Kurve -.-.-. gibt den Umsatz der ätherlöslichen Produkte wieder, während die Summenkurve ----- den Verlust an Radioaktivität im Verlauf der Inkubation zeigt.
System Mikrosomen + Überstand.
Pro Ansatz 1,8 μM NADPH₂ und $6,3 \cdot 10^4$ IpM.

Zellüberstand wirkt also auf dreierlei Weise:

- 1.) er verhindert, daß die Metabolisierung des Oestrone nach kurzer Zeit zum Stillstand kommt; den gleichen Effekt erzielt man, wenn man im Mikrosomenansatz Phosphat- durch Trispuffer ersetzt (wie später gezeigt wird, lassen sich beide Phänomene auf eine NADPH₂- "konservierende" Wirkung zurückführen);
- 2.) er katalysiert die Bildung wasserlöslicher Metaboliten;

⁺) dieser Versuch wurde gemeinsam mit Herrn Dipl.-Chem. G. Walter durchgeführt.

- 3.) er enthält einen durch Tetrahydropteridin zu ersetzenden Faktor, in dessen Gegenwart o-hydroxylierte Oestrogene isoliert werden können; der Faktor hemmt den Oestronumsatz und einzelne Stoffwechselreaktionen (Proteinbindung, p-Hydroxylierung) mäßig; er wird während der Inkubation irreversibel verbraucht (vgl. Abb. 16).

H) Zur mikrosomalen NADPH₂-Oxydation

Wie man aus verschiedenen Arbeiten weiß (86,87), sind Rattenlebermikrosomen in der Lage, NADPH₂ in relativ schneller Reaktion aerob zu oxydieren. Die Stöchiometrie entspricht der Gleichung



Freies Wasserstoffperoxyd ist jedoch nicht nachweisbar. Diese Dehydrierung steht wahrscheinlich mit den NADPH₂-abhängigen Hydroxylierungsreaktionen des endoplasmatischen Retikulums in irgendeinem Zusammenhang. Sie wurde daher in Hinblick auf den oxydativen Stoffwechsel des Oestrons näher untersucht. Die methodischen Einzelheiten findet man in Abschnitt II/C.

Abb. 20 zeigt zunächst, daß die Geschwindigkeit der NADPH₂-Oxydation eindeutig von der Mikrosomenkonzentration abhängt, die Reaktion also offenbar enzymkatalysiert ist.

(86) J.R.Gillette, B.B.Brodie, B.N.LaDu, J.Pharm.Exp.Path. 119, 532 (1957)

(87) H.J.Staudinger, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 332, 109 (1963) (zus. mit Szubrzycki)

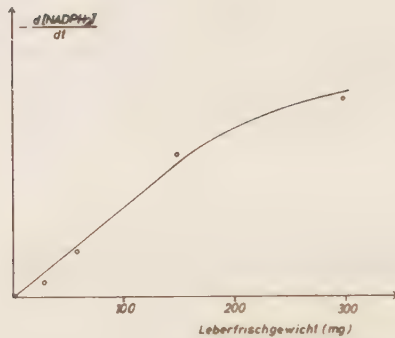


Abb. 20: Geschwindigkeit der mikrosomalen NADPH₂-Oxydation als Funktion der Mikrosomenmenge (angegeben in mg Frischleberäquivalenten). Pro Ansatz 200 µg NADPH₂. Raumtemperatur.

In den folgenden Versuchen wurde stets mit 200 µg NADPH₂ und einer Mikrosomenmenge, die 60 mg Frischleber entspricht, inkubiert; man hat dann das gleiche Enzym-Substrat-Verhältnis wie in den Ansätzen zur Untersuchung der Oestronhydroxylierung, jedoch eine aus optischen Gründen geringere Konzentration. Falls die NADPH₂-Dehydrierung direkt mit der Hydroxylierung des Oestrone verknüpft sein sollte, müßte das Hormon die Geschwindigkeit der Reaktion beeinflussen.

Aus Abb. 21 erkennt man jedoch, daß das nicht der Fall ist: die NADPH₂-Brutto-Oxydation bleibt auch in Gegenwart größerer Oestronmengen völlig konstant.

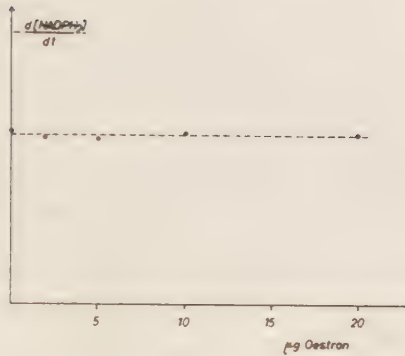


Abb.21: Oxydationsgeschwindigkeit von NADPH₂ in Mikrosomen in Gegenwart steigender Oestronmengen. 200 μg NADPH₂ pro Ansatz. Raumtemperatur.

Das Stoffwechselprodukt 2-Hydroxy-oestron wirkt dagegen deutlich hemmend (Abb. 22).

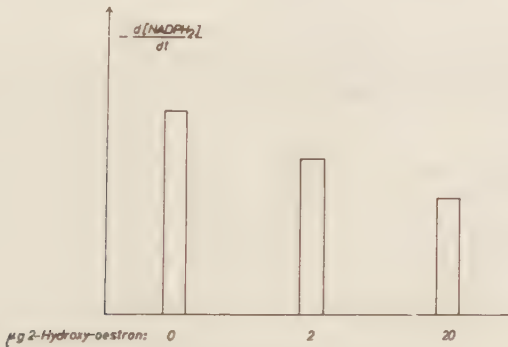


Abb. 22: Hemmung der mikrosomalen NADPH₂-Oxydation durch 2-Hydroxy-oestron. 200 μg NADPH₂. Zimmertemperatur.

Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung weiterer Hemm- und Aktivierungsversuche mit solchen Agenzien, deren Einfluß auf die Oestronhydroxylierung getestet wurde. Man erkennt, daß die Dehydrierung des NADPH_2 nur durch Zellüberstand, Cystein, o-Phenanthrolin und α, α' -Dipyridyl mäßig verlangsamt wird, während α -Benzoinoxim, Fluorid Azid, Cyanid, Katalase (auch in sehr hoher Konzentration) und Ascorbinsäure praktisch ohne Einfluß sind. Dagegen beschleunigen Peroxydase und die Flavinnukleotide die Reaktion, wobei zwischen FMN und FAD kein Unterschied festzustellen ist; auch die schon länger bekannte Aktivierung durch Cytochrom c (86) wurde bestätigt (Tab. 26).

Tab. 26: Einfluß verschiedener Hemmstoffe und Aktivatoren auf die mikrosomale NADPH_2 -Oxydation. 200 μg NADPH_2 . Zimmertemperatur.

Agens	Konz.	Prozentuale Hemmung
Ascorbinsäure	10^{-3}m	15
Cystein	10^{-3}m	30
Cystein	10^{-2}m	35
Katalase	0,3 mg/ml	0
Peroxydase	0,03 mg/ml	60 % Aktivierung
Peroxydase	0,06 mg/ml	120 % Aktivierung
Cytochrom c	0,1 mg/ml	60 % Aktivierung
o-Phenanthrolin	10^{-3}m	25
α, α' -Dipyridyl	"	20
α -Benzoinoxim	"	0
NaF	"	0
NaN_3	"	0
KCN	"	0
Zellüberstand	Mikros.äquiv.	40
FAD	$4,2 \cdot 10^{-5}\text{m}$	125 % Aktivierung
FAD	$8,4 \cdot 10^{-5}\text{m}$	200 % Aktivierung
FMN	$4,2 \cdot 10^{-5}\text{m}$	140 % Aktivierung
FMN	$8,4 \cdot 10^{-5}\text{m}$	190 % Aktivierung

Schließlich war es von Interesse, die Wirkung verschiedener Puffer zu untersuchen, da die für die Metabolisierung des Oestrone repräsentative mikrosomale Proteinbindung in Trispuffer längere Zeit als in Phosphatpuffer abläuft (Abb. 18). Wie Abb. 23 zeigt, wird die NADPH_2 -Dehydrierung verlangsamt, wenn man Phosphat- durch Trispuffer ersetzt; der reduzierte Pyridincofaktor steht also in Gegenwart von Trispuffer länger für Hydroxylierungsreaktionen zur Verfügung.

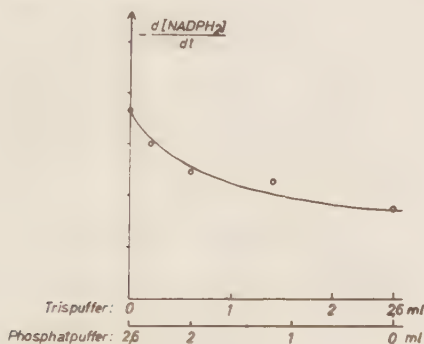


Abb. 23: Verlangsamung der mikrosomalen NADPH_2 -Oxydation bei Übergang von 0,15 m Phosphatpuffer auf 0,1 m Trispuffer von pH 7,4. 200 μg NADPH_2 pro Ansatz. Raumtemperatur.

Die Untersuchung der mikrosomalen NADPH_2 -Oxydation hat somit zu folgendem Ergebnis geführt:

Die enzymatisch katalysierte Reaktion steht in keinem stöchiometrischen (direkten) Zusammenhang mit der Metabolisierung des Oestrone; beide Vorgänge scheinen vielmehr miteinander zu konkurrieren, da Zusätze, welche die NADPH_2 -Dehydrierung verlangsamen (Zellüberstand, Trispuffer, u.U. auch o-Phenanthrolin und Dipyridyl) bzw. beschleunigen (Cytochrom c, FAD, FMN) bestimmte Stoffwechselreaktionen des Oestrone aktivieren bzw. hemmen. Im Gegensatz zum Oestronstoffwechsel wird die NADPH_2 -Oxydation durch Ascorbinsäure, Azid und Cyanid so gut wie nicht gehemmt, jedoch auch nicht aktiviert.

IV) D i s k u s s i o n

Im folgenden soll versucht werden, die in dieser Arbeit untersuchten Stoffwechselreaktionen des Oestrone unter dem Gesichtspunkt eines einheitlichen enzymatischen Mechanismus zusammenzufassen. Als Ausgangsbasis dient die einleitend erwähnte Arbeitshypothese von Hecker und Zayed (25,50). Die am Oestron gewonnenen Ergebnisse sowie neue Erkenntnisse über den Ablauf enzymatischer Hydroxylierungen erlauben es, sie so zu erweitern und zu präzisieren, daß sie nicht nur eine befriedigende Deutung der hier erzielten Befunde ermöglicht, sondern darüber hinaus zur Grundlage einer allgemeineren mechanistischen Hypothese unspezifischer mikrosomaler Hydroxylierungsvorgänge wird.

I) Das Verhältnis der mikrosomalen Stoffwechselreaktionen des Oestrone zueinander.

Der durch Lebermikrosomen katalysierte Stoffwechsel des Oestrone ist ein komplexer Vorgang, der zu einer Fülle verschiedener Metaboliten führt. Wie Tabelle 27 zeigt, können die im Hinblick auf den enzymatischen Mechanismus besonders interessanten ätherlöslichen Primärprodukte abgefangen werden, wenn man nur kurze Zeit inkubiert, während sie bei längerer Inkubation - vor allem in Gegenwart von Überstand - nahezu vollständig in proteingebundene und wasserlösliche Stoffe umgewandelt werden. Aus der Ätherphase läßt sich eine Reihe hydroxylierter Oestrone isolieren, darunter neuartige Typen wie 4- und eventuell 1-Hydroxy-oestron und 17-Oxo-oestra-p-chinon-(10ß) sowie bisher nur als Harnmetaboliten bekannte, wie 2-, 16α- und 16β-Hydroxy-oestron und - als unmittelbare Folgeprodukte - 6- und 16-Oxo-oestron. Diese Verbindungen machen maximal 30 % der ätherlöslichen Metaboliten aus. Zusammen mit proteingebundenen Derivaten werden 30-40 %

aller Oestronmetaboliten als bekannte Stoffe erfaßt; der Rest kann neben noch unbekannten Stoffwechselprodukten neuartigen Typs möglicherweise aus mehrfach hydroxylierten Oestronen bestehen.

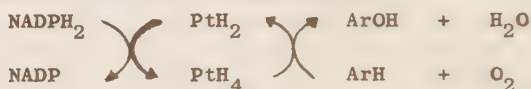
Tab. 27: Prozentualer Anteil einzelner Reaktionsprodukte am Oestronstoffwechsel in Rattenleber in Gegenwart von NADPH₂ und Sauerstoff. Bezogen auf umgesetztes Oestron.

Ansatz: Inkubationszeit:	Mikrosomen 15 min.	Mikrosomen + Überstand 15min. 1,5Std. 3Std.		
Wasserlösliche Metab.	2	3-10	30	30
Proteingebundene Metab.	15-20	10-15	30-60	40
Ätherlös. Metab.	70-80	70-80	25	10
1-Hydroxy-oestron	0,4 ?	0,3 ?	?	?
2-Hydroxy-oestron	0,2	10-12	2	?
4-Hydroxy-oestron	0,3	0,7	?	?
17-Oxo-oestra-p-chinol	3,5	0,5-1,0	?	?
6α-Hydroxy-oestron	0,6	0,6	?	?
16α-Hydroxy-oestron	0,6	0,6	0	?
16β-Hydroxy-oestron	0,2	0,2	?	?
6-Oxo-oestron	5-6	5-6	?	?
16-Oxo-oestron	0,2	?	?	?

o-Hydroxylierung und Proteinbindung

Lokalisierung, Cofaktorbedarf und Hemmbarkeit deuten darauf hin, daß sowohl der o-Hydroxylierung als auch der Proteinbindungsreaktion das gleiche Enzymsystem zugrunde liegt; die ursprüngliche Annahme, daß primär gebildete Phenoxyldradikale einerseits mit Sauerstoff und andererseits mit Protein kombinieren, scheint daher zunächst gerechtfertigt zu sein, führt jedoch - worauf schon Hecker und Zayed in anderem Zusammenhang hingewiesen haben - zu einer Reihe von Widersprüchen. So lassen sich 2- und 4-Hydroxy-oestron nur in Gegenwart von Zellüber-

stand oder Tetrahydrofolsäure in größeren Mengen isolieren, während die Proteinbindung durch beide Zusätze gehemmt wird. Die o-Hydroxylierung scheint somit im Gegensatz zur Proteinbindung einem ähnlichen Mechanismus zu folgen wie die enzymatische p-Hydroxylierung des Phenylalanins, bei der ein Tetrahydropteridin PtH_4 , welches ebenfalls durch Tetrahydrofolsäure ersetzt werden kann, als vermittelndes Redoxsystem zwischen $NADPH_2$ und Sauerstoff fungiert (88):



Die folgenden Befunde stehen jedoch im Widerspruch zu dieser Auffassung:

- 1.) Ohne $NADPH_2$ läßt sich auch bei großem Überschuß von PtH_4 kein o-Hydroxy-oestron nachweisen;
- 2.) in Anwesenheit von $NADPH_2$ sind katalytische Mengen PtH_4 nicht in der Lage, die Reaktion zu unterhalten; erst bei höheren PtH_4 -Konzentrationen kann o-Hydroxy-oestron isoliert werden;
- 3.) Ascorbinsäure, welche $NADPH_2$ bei der Hydroxylierung des Phenylalanins ersetzen kann (88), ist für die 2-Hydroxylierung des Oestrone ein starker Hemmstoff;
- 4.) der "Tetrahydrofolsäureantagonist" Aminopterin - ein Inhibitor der Phenylalaninhydroxylierung (88) - hemmt die 2-Hydroxylierung des Oestrone nicht, sondern wirkt eher stimulierend.

Der unbekannte Überstandsfaktor und das Tetrahydropteridin müssen daher im Falle des Oestrone auf andere Weise als bei der Hydroxylierung des Phenylalanins wirken.

(88) S.Kaufman in O.Hayaishi, Oxygenases, S.129 ff.; Academic Press, London und New York, 1962

Am nächsten liegt der Gedanke, daß die Proteinbindung Folgereaktion der o-Hydroxylierung ist. Tatsächlich zeigen kinetische Messungen, daß die Bildung von 2-Hydroxy-oestron in Gegenwart von Zellüberstand ein Maximum durchläuft, um nach längerer Inkubation wieder auf Null zurückzugehen, während die Proteinbindung nach einer deutlich ausgeprägten Induktionsperiode, während der 2-Hydroxy-oestron akkumuliert, linear zunimmt. Im überstandsfreien Mikrosomensystem hat die Proteinbindung dagegen keine Anlaufzeit; damit übereinstimmend läßt sich auch praktisch kein 2-Hydroxy-oestron isolieren. Das o-Diphenol wird also in diesem System schneller verbraucht als gebildet; vergleicht man die Anfangsgeschwindigkeit der 2-Hydroxylierung mit der Geschwindigkeit der Proteinbindung (im linearen Teil der Kinetik), so erkennt man jedoch, daß der Geschwindigkeitsunterschied zwischen beiden Reaktionen nur gering ist. Diese Tatsache kann als ein weiterer Hinweis darauf gewertet werden, daß beiden Vorgängen gleichartige enzymatische Primärschritte zugrunde liegen, die - wie weiter oben erläutert - wahrscheinlich durch ein Enzymsystem katalysiert werden. Nimmt man an, daß es sich hierbei um homolytische Dehydrierungen phenolischer Hydroxylgruppen handelt, so wird die Geschwindigkeitsdifferenz zwischen beiden Reaktionen verständlich, da Semichinonradikale leichter entstehen als Phenoxylradikale. Danach sollten o-Chinone die zur Proteinbindung führenden Folgeprodukte der o-Hydroxy-oestrone sein.

Daß 2-Hydroxy-oestron ebenso wie Oestron selbst ein Substrat des mikrosomalen Enzymsystems ist, läßt sich auch indirekt dadurch zeigen, daß es in höherer Konzentration den Bruttoumsatz, die Proteinbindung und die 10ß-Hydroxylierung hemmt. Offensichtlich konkurriert es ähnlich wie der Inhibitor 2,4-Dichlorophenol mit Oestron um das Enzym. Da es nicht radioaktiv markiert war, ließ sich seine Bindung an Protein nicht direkt nachweisen.

Proteinbindung ist eine weit verbreitete Begleiterscheinung enzymatischer Aromatenhydroxylierungen in vitro. Die Möglichkeit, daß sie über o-Chinone verläuft, wurde im Falle der Oestrogene zuerst von Riegel und Mueller (48) diskutiert.

Den gleichen Mechanismus forderte Jellinck (63) für die starke Proteinmarkierung während der durch Phenolase katalysierten Oxydation von Oestron-(16-¹⁴C); die Inaktivierung des gleichen Enzyms während der Reaktion mit Brenzcatechin wurde ebenfalls schon frühzeitig als Reaktion des o-Chinons mit dem Fermentprotein gedeutet (89). Bei der Proteinbindung von 2-Amino-1-naphthol, dem cancerogenen Metaboliten des β -Naphthylamins, mit Albumin in Gegenwart von Cytochrom c muß das o-Chinon bzw. o-Chinonimin als aktive Zwischenstufe formuliert werden (90). Viele Aromaten werden während ihrer Hydroxylierung durch Lebermikrosomen/NADPH₂/O₂ in ganz ähnlicher Weise wie Oestron an Protein fixiert (91); kürzlich konnte gezeigt werden, daß hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit o-Chinone die Bindung eingehen (92,93). Die Reaktion wurde verschiedentlich im Zusammenhang mit dem Mechanismus der Carcinogenese diskutiert.

Da die Oxydation des o-Hydroxy-oestrone schneller verläuft, als seine Bildung, kann die Verbindung nur isoliert werden, wenn ihr Verbrauch gehemmt oder rückgängig gemacht wird. Das ist offenbar mit Überstand oder mit Tetrahydrofolsäure möglich; man darf annehmen, daß der unbekannte Überstandsfaktor bzw. das Tetrahydropteridin das Oxydationsprodukt (o-Chinon?) des o-Diphenols reduzieren können, bevor es an Protein gebunden wird. Die Reduktionsmittel werden dabei irreversibel verbraucht; denn es werden wesentlich mehr als katalytische Mengen THFS benötigt, und 2-Hydroxy-oestron kann erst oberhalb einer bestimmten Mindestkonzentration des Tetrahydropteridins in signifikant erhöhter Menge gefaßt werden. Für den Verbrauch des Überstandsfaktors spricht der Befund, daß er die Proteinbindung nicht dauernd hemmt, sondern im kinetischen Experiment lediglich eine Induktionsperiode verursacht, während der sich 2-Hydroxy-oestron ansammelt; nach Verschwinden des Faktors (nach Beendigung der Induktionsperiode) nimmt

-
- (89) M.Graubard, J.M.Nelson, J.biol.Chemistry 111, 757 (1935)
 - (90) S.Belman, W.Troll, J.biol.Chemistry 237, 746 (1962)
 - (91) E.C.Miller, J.A.Miller, Ann.Rev.Biochem. 28, 291 (1959)
 - (92) C.M.King, H.R.Gutmann, S.F.Chang, J.biol.Chemistry 238, 2199 (1963)
 - (93) C.M.King, S.F.Chang, H.R.Gutmann, J.biol.Chemistry 238, 2206 (1963)

die Konzentration des o-Diphenols wieder ab. Die folgende Abbildung macht diese Zusammenhänge noch einmal deutlich:

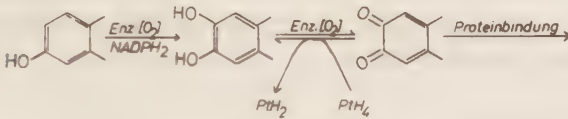


Abb. 24: Vermutlicher Zusammenhang zwischen 2-Hydroxylierung und Proteinbindung von Oestron; Wirkung von Tetrahydrofolsäure PtH₄ (bzw. Überstandsfaktor).

Trotz ihrer augenscheinlich unspezifischen, d.h. nichtenzymatischen Reduktionswirkung kann Tetrahydrofolsäure nicht durch ein beliebiges anderes Reduktionsmittel ersetzt werden, da dieses außer der Fähigkeit, das Oxydationsprodukt des o-Hydroxy-oestrone zu reduzieren zu können, eine weitere Eigenschaft haben muß: es darf die enzymatische Primärdehydrierung des Phenols bzw. o-Diphenols nicht aktivieren (wie z.B. NADPH₂), aber auch nicht so weit unterdrücken, daß keine o-Hydroxylierung mehr stattfindet (wie z.B. Ascorbinsäure). Tetrahydrofolsäure - welche den Gesamtumsatz des Oestrone nur mäßig hemmt - scheint allen diesen Anforderungen zu genügen, möglicherweise aus sterischen und eventuell auch aus elektronischen Gründen.

Die 2-Hydroxylierung kann als dominierende der primären Stoffwechselreaktionen des Oestrone in vitro angesehen werden, da sie bei Berücksichtigung ihrer Folgereaktion, der Proteinbindung, je nach "Enzympräparation" mehr als die Hälfte des eingesetzten Substrates erfaßt. Die Proteinbindung steigt auch nach Verbrauch des 2-Hydroxy-oestrone noch einige Zeit weiter an, so daß man annehmen muß, daß auch andere Metaboliten des Oestrone in 2-Stellung hydroxyliert und an Protein gebunden werden; in der Tat findet die 2-Hydroxylierung mit Oestriol - dessen Bildung über 16 α -Hydroxy-oestron formuliert wird (25) - unter den gleichen Bedingungen wie mit Oestron statt (27).

In vivo wurde die hier untersuchte Art der homöopolaren Proteinbindung bisher nicht nachgewiesen: würde sie auftreten, so sollte sie zu einer Schädigung der Zelle und ihres enzymatischen Apparates führen (vgl. "enzyme-deletion"-Hypothese der Carcinogenese); möglicherweise wird sie durch einen mit der o-Hydroxylierung gekoppelten Mechanismus - z.B. die bekannte Methylierung der 2-Hydroxygruppe - verhindert.

p-Hydroxylierung

Im Gegensatz zur Proteinbindung sollte die p-Hydroxylierung eine Parallelreaktion der o-Hydroxylierung sein. Die Annahme, daß beide Reaktionen durch das gleiche Enzymsystem katalysiert werden und nach gleichem Mechanismus verlaufen, liegt nahe. Es überrascht daher zunächst, daß sich die p-Hydroxylierung in vieler Hinsicht anders als die o-Hydroxylierung bzw. Proteinbindung verhält:

- 1.) Sie ist wesentlich schneller, kommt aber schon nach kurzer Zeit zum Stillstand (vgl. auch (50));
- 2.) sie erfordert nur sehr wenig, häufig sogar überhaupt kein NADPH_2 ;
- 3.) sie wird durch α, α' -Dipyridyl-, o-Phenanthrolin, Tetrahydrofolsäure, Überstand und 2-Hydroxy-oestron, nicht aber durch Ascorbinsäure und Cytochrom c gehemmt.

Eine Deutung dieser Unterschiede ist mit der einfachen Hypothese, wie sie von Hecker und Zayed formuliert wurde, nicht mehr möglich. Wie im zweiten Teil der Diskussion gezeigt werden soll, gelangt man jedoch mit Hilfe zusätzlicher theoretischer Überlegungen zu einer Erklärung für das verschiedene Verhalten der beiden aromatischen Hydroxylierungsarten. Damit bleibt die primäre homolytische Phenoldehydrierung eine plausible und naheliegende Arbeitshypothese für die zum p-Chinol führende 10ß-Hydroxylierung des Oestrone.

Auch die nichtenzymatische Chinolbildung, z.B. bei aerober Oxydation von 2,4,6-Trialkylphenolen in alkalischer Lösung, wird durch eine Homolyse eingeleitet (94); die in diesem Fall durch Spurenkatalyse gebildeten Primärradikale addieren bevorzugt Sauerstoff, wobei Chinolhydroperoxyde entstehen, welche verschiedentlich als Zwischenprodukte isoliert wurden (95, 96); sie werden reduktiv oder hydrolytisch in p-Chinole umgewandelt. Da das Phenolation energieärmer als das Chinolhydroperoxydianion ist, stellt sich zwischen Phenol, Sauerstoff, Katalysator K und den oxygenierten Zwischenstufen das in Abbildung 25 wiedergegebene Gleichgewicht ein (97).

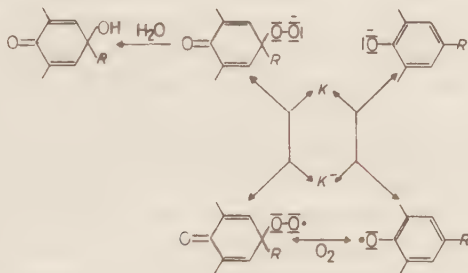


Abb. 25: Gleichgewicht der aeroben Chinolbildung aus 2,4,6-Trialkylphenolen (K = Katalysator)

Auf diese Formulierung, die sich möglicherweise auf enzymatische Verhältnisse übertragen läßt, wird an anderer Stelle zurückzukommen sein.

Ob ähnlich wie o-Hydroxy-oestron auch 17-Oxo-oestra-p-chinol-(108) durch Folgereaktionen weiterverändert wird, ist nicht bekannt. 1,4-Dihydroxy-oestratrienon-(17), das Produkt einer möglichen Dienon-Phenol-Umlagerung, läßt sich nicht nach-

(94) H.Musso, Angew.Chemie 75, 974 (1963)

(95) M.S.Kharasch, B.Joshi, J.Org.Chem. 22, 1439 (1957)

(96) K.Ley, Angew.Chemie 70, 74 (1958)

(97) H.R.Gersman, A.F.Bickel, J.Chem.Soc. 1959, 2711; 1962, 2356

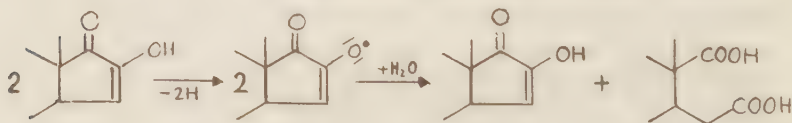
weisen, wobei allerdings berücksichtigt werden muß, daß dieses p-Diphenol sicher ähnlich schnell wie 2-Hydroxy-oestron weiteroxydiert wird; das "Antioxydans" Tetrahydrofolsäure hemmt andererseits die Chinolbildung.

Aliphatische Hydroxylierung

Nach der phenolischen Hydroxylgruppe sind die Stellungen 6 (Benzylstellung) und 16 (α -Stellung zur Oxofunktion) des Oestronmoleküls einer homolytischen (oder auch heterolytischen) Primärdehydrierung durch das mikrosomale Enzymsystem am leichtesten zugänglich, da die entstehenden Radikale mesomeriestabilisiert sind. In der Tat entstehen die entsprechenden Hydroxy-oestrone in NADPH_2 -abhängigen Reaktionen. Sie werden jedoch als Benzylalkohole bzw. Acyloine ähnlich leicht wie 2-Hydroxy-oestron weiterdehydriert; im Gegensatz zu der bisherigen Annahme (25) scheint das mikrosomale Enzymsystem auch diese Folgereaktionen katalysieren zu können, da die im Überstand lokalisierten 6α - und 16α -Dehydrogenasen zur Bildung von 6- und 16-Oxo-oestron nicht erforderlich sind.

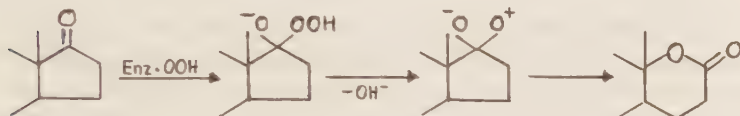
Während sich 6-Oxo-oestron in relativ größerer Menge ansammelt, wird - wie die kinetischen Messungen zeigen - die 16-Oxoverbindung rasch verbraucht; über die sich dabei abspielenden Folgereaktionen können nur Vermutungen angestellt werden.

So ist es möglich, daß 16-Oxo-oestron, welches als Cyclopentadienon (98) praktisch vollständig enolisiert sein sollte, erneut dehydriert wird und das Enolradikal entweder in Position 15 Sauerstoff addiert (Hydroxylierung!) oder unter Ringöffnung dismutiert:



(98) E.S.Gould, Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie, S. 449, Verlag Chemie, Weinheim, 1962

Daneben muß sowohl für Oestron selbst als auch für 16-Oxo-oestron die Möglichkeit diskutiert werden, daß sich freies oder enzymatisch aktiviertes Hydroperoxyd an die Carbonylgruppen addiert und es in einer Art Baeyer-Villiger-Reaktion zur Bildung von cyclischen Lactonen kommt, die bereits Westerfeld (99) postuliert hat:



Analoge Reaktionen, welche NADPH_2 und Sauerstoff erfordern, finden am Androstendion und Progesteron statt und werden durch bakterielle Enzyme katalysiert (100,101). Sie sind auch für Lebermikrosomen recht wahrscheinlich, da die mikrosomale NADPH_2 -Oxydation Wasserstoffperoxyd in gebundener Form bereitstellt (86,87); darüber hinaus hat - wie an anderer Stelle erläutert wird - der aktive Enzym-Sauerstoff-Komplex des mikrosomalen Hydroxylasesystems eventuell eine peroxydartige Struktur.

II) Die Oestronhydroxylierungen als Spezialfälle unspezifischer mikrosomaler Hydroxylierungen.

Bislang wurde vorausgesetzt, daß die Hydroxylgruppen der Oestrogenmetaboliten aus dem Sauerstoff der Luft stammen, eine Vermutung, die unmittelbar aus der Annahme eines radikalischen Reaktionsmechanismus folgt, für die es jedoch noch keine direkten Beweise gibt. Die Eigenschaften der mikrosoma-

-
- (99) W.W.Westerfeld, J.biol.Chemistry 143, 177 (1942)
 - (100) C.H.Holmlund, R.H.Blank, K.H.Sax, R.H.Evans, Arch. Biochem.Biophysics 103, 105 (1963)
 - (101) R.L.Prairie, P.Talalay, Biochemistry 2, 203 (1963)

len "Oestronhydroxylase" lassen trotzdem kaum daran zweifeln, daß sie zur Familie der gemischt-funktionellen Oxygenasen (102) gehört, also ein Enzymsystem ist, welches aerobe Hydroxylierungen katalysiert, bei denen entsprechend der Gleichung



ein Atom des Sauerstoffmoleküls in das Substrat RH eintritt, während das andere von einem Elektronendonator DH_2 - hier NADPH_2 - zu Wasser reduziert wird. Die Hydroxylierungsreaktionen am Oestron werden damit zu einem Spezialfall einer umfangreichen Gruppe mikrosomaler Oxydationsvorgänge der Leber, die zwar auf den ersten Blick recht vielfältig zu sein scheinen, mechanistisch jedoch alle dem gemischt-funktionellen Oxygenasetyp angehören, d.h. Sauerstoff und NADPH_2 erfordern.

Sie dienen der Umwandlung von Steroiden (Inaktivierung von Hormonen!) und von meist körperfremden Stoffen wie cancerogenen Aromaten (91) und Arzneimitteln (103). Neben eigentlichen Hydroxylierungen findet man Reaktionen wie oxydative Desaminierungen und N- und O-, sowie C-Dealkylierungen, Oxydationen von Thioäthern zu Sulfoxiden und von Aminen zu Hydroxylaminen und Aminoxyden, Epoxydierungen und Additionen von Hydroperoxyd (Bildung von 1,2-Dihydrodiolen).

Abgesehen vom gleichen enzymatischen Reaktionstyp erkennt man als weitere gemeinsame Merkmale:

- 1.) es handelt sich überwiegend um solche Vorgänge, die sich chemisch mit Peroxyverbindungen nachahmen lassen; man kann daher vermuten, daß auch die katalytisch aktive Enzymstruktur "peroxydartig" ist, womit zugleich die Frage nach der Art der enzymatischen Sauerstoffaktivierung gestellt ist.

In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß schon 1922 von Dakin postuliert wurde, die bei der Inaktivierung der Follikelhormone im Organismus stattfindenden Reaktionen seien hydroperoxyd-abhängigen Oxydationen ähnlich (104), ein Gedanke, der später besonders von Westerfeld

(102) H.S.Mason, Adv.in Ezymology 19, 79 (1957)

(103) M.Kiese, Symposium Redoxfkt. Cytoplasmat.Strukturen, S.1, Wien 1962

(104) H.D.Dakin, Oxydations and reductions in the animal body, Monographs on Biochem., London, 2nd edition (1922)

aufgegriffen und verfochten wurde (105). In der Tat ist Wasserstoffperoxyd in der Lage, Oestrogene zu inaktivieren (106).

- 2.) Die Reaktionen lassen sich vielfach durch radikalische oder hydroxylierte Zwischenstufen deuten, also ohne weiteres in die für die Hydroxylierung des Oestrone postulierte Arbeitshypothese einordnen. Für einige der mikrosomalen Aromatenhydroxylierungen konnte der homolytische Ablauf indirekt nachgewiesen werden (107-109).

Durch Experimente mit $^{18}\text{O}_2$ wurde der direkte Einbau von Luftsauerstoff für die N-Oxydation von Trialkylaminen (110), die 11 β -Hydroxylierung von Steroiden (111) und die unspezifische aromatische Hydroxylierung von Acetanilid (112) bewiesen, womit die Zuordnung dieser Reaktionen zum Oxygenasetyp gesichert ist.

Experimente mit Inhibitoren führen zu weiteren Übereinstimmungen zwischen den einzelnen mikrosomalen Oxygenasereaktionen; so aktivieren α,α' -Dipyridyl und o-Phenanthrolin nicht nur die (o-) Hydroxylierung des Oestrone, sondern auch die des Naphthalins (113) in gleichem Maße (15 bzw. 35 %), während α,α' -Dipyridyl neben der p-Hydroxylierung des Oestrone auch die p-Hydroxylierung von Anilin (108) und Chinolin (114) hemmt; p-CMB wirkt ebenso wie 2,4-Dichlorophenol bei so gut

-
- (105) W.W.Westerfeld, Biochem.J. 34, 51 (1940)
 (106) S.A.Thayer, C.N.Jordan, E.A.Doisy, J.biol.Chemistry 79, 53 (1928)
 (107) C.Mitoma, S.Udenfriend, J.Pharmacol.Exp.Ther. 113, 40 (1955)
 (108) C.Mitoma, H.S.Posner, H.C.Reitz, S.Udenfriend, Arch. Biochem. 61, 431 (1956)
 (109) R.M.Acheson, S.Gibbard, Biochim.biophysica Acta 59, 320 (1962)
 (110) J.R.Baker, S.Chaykin, J.biol.Chemistry 237, 1309 (1962)
 (111) M.Hayano, M.C.Lindberg, R.I.Dorfman, J.E.H.Hancock, W.E.Doering, Arch.Biochem.biophysics 59, 529 (1956)
 (112) O.Hayaishi, S.Rothberg, A.H.Mehler, Abstr. 130th Meeting Amer.chem.Soc., Atlantic City, S.53, C, 1956
 (113) J.Booth, E.Boyland, Biochem.J. 70, 681 (1958)
 (114) H.S.Posner, C.Mitoma, S.Udenfriend, Arch.Biochem.biophysics 94, 269 (1961)

wie allen untersuchten Reaktionen hemmend (103); Ascorbinsäure unterbindet nicht nur die Hydroxylierung des Oestrons sondern auch die des Anilins (108), während Azid auch die Seitenkettenoxydation von Phenobarbital verlangsamt (115). Daneben findet man jedoch eine Reihe von Abweichungen im Verhalten gegenüber Hemmstoffen, die aber keineswegs Beweise für eine Vielzahl von Fermenten sind, da in keinem Fall kinetische Messungen vorliegen, häufig verschiedene Tierspezies gewählt wurden und Interpretationen derartiger Experimente angesichts des sicher komplexen Mechanismus der betreffenden Reaktionen schwierig sind.

Auf Grund der angeführten Befunde kann man versuchen, einen einheitlichen Mechanismus nicht nur für die verschiedenen Umwandlungen des Oestrons sondern auch für alle mikrosomalen Oxygenasereaktionen zu diskutieren: Lebermikrosomen enthalten ein gemischt-funktionelles Oxygenasesystem, welches in unspezifischer Weise - wahrscheinlich homolytische - Dehydrierungen katalysiert; die dabei entstehenden "Primärradikale" reagieren je nach ihrer Struktur weiter (bevorzugt unter Oxygenierung), wobei Verbindungen auftreten, welche erneut vom gleichen Enzym dehydriert werden usw.; schließlich isoliert man chemisch sehr unterschiedliche Produkte. Dies täuscht eine Vielzahl enzymatischer Reaktionen und damit eine Vielzahl verschiedener Fermente vor, während in Wirklichkeit der enzymatisch katalysierte Primärschritt stets der gleiche ist.

Ein Beispiel, welches diese Annahme gut illustriert, ist die in dieser Arbeit genauer untersuchte Reaktionsfolge Oestron $\rightarrow$ 2-Hydroxy-oestron $\rightarrow$ (17-Oxo-oestra-o-chinon) $\rightarrow$ Proteinbindung.

(115) J.R.Cooper, B.B.Brodie, J.Pharmacol.Exp.Ther. 114, 409 (1955)

III) Zum Mechanismus der mikrosomalen Hydroxylase

Bisher ist es trotz vielfacher Bemühungen (vgl. dazu auch (103)) nicht gelungen, das mikrosomale Oxygenasesystem unverändert in Lösung zu bringen und zu isolieren. Trotzdem erlauben es sowohl die Untersuchungen am vollständigen endoplasmatischen Retikulum als auch Studien an "Modellfermenten", Aussagen über die Natur des mikrosomalen Enzymsystems zu machen.

Unter den ähnlich reagierenden Enzymen fallen vor allem einige Haemoproteinoxxygenasen durch ein der mikrosomalen Hydroxylase weitgehend analoges Verhalten auf.

So kann z.B. mit Peroxydasen ein überwiegender Teil der mikrosomalen Oxygenasereaktionen (68,102,116-123), darunter auch radikalisch verlaufende Aromatenhydroxylierungen (117, 118) nachgeahmt werden. Auch andere Haemoproteine, wie Katalase, Metmyoglobin (120,121) und das System Cytochromoxydase/Cytochrom c (124) können die mikrosomale Hydroxylase bei verschiedenen Reaktionen, z.B. Aromatenhydroxylierungen (124), vertreten.

Besonderes Interesse verdient die aerobe peroxydasekatalysierte Oestrogeninaktivierung (67-70), die ebenfalls NADPH_2 oder NADH_2 als Wasserstoffdonator erfordert (68), durch Cyanid, Azid, Ascorbat und Katalase gehemmt wird (68) und wie die entsprechende mikrosomale Reaktion zu einem Gemisch ätherlöslicher, wasserlöslicher (70) und proteingebundener

-
- (116) B.B.Brodie, J.R.Gillette, B.N.LaDu, *Annu.Rev.Biochem.* **27**, 427 (1958)
 - (117) H.S.Mason, L.Onopryenko, D.Buhler, *Biochim.biophysica. Acta (Amsterdam)* **24**, 225 (1957)
 - (118) D.R.Buhler, H.S.Mason, *Arch.Biochem.Biophysics* **92**, 424 (1961)
 - (119) H.Booth, B.C.Saunders, *J.chem.Soc.* 1956, 940
 - (120) J.R.Gillette, J.V.Dingell, B.B.Brodie, *Nature (London)* **181**, 898 (1958)
 - (121) D.J.Cavanaugh, *Science* **125**, 1040 (1957)
 - (122) T.Akazawa, E.E.Conn, *J.Biol.Chemistry* **232**, 403 (1958)
 - (123) S.J.Klebanoff, *Biochim.biophysica Acta (Amsterdam)* **44**, 501 (1960); **48**, 93 (1961)
 - (124) O.Pihar, *Coll.Czech.Chem.Comm.* **22**, 1503 (1957)

(69) Metaboliten führt, Ergänzend dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß Meerrettichperoxydase neben der mikrosomalen NADPH₂-Oxydation auch die p-Hydroxylierung und Proteinbindung des Oestrone aktiviert, während Katalase beide Reaktionen hemmt, wozu jedoch wesentlich höhere Konzentrationen als zur Unterbindung echter Peroxydasereaktionen benötigt werden; dieses deutet erneut darauf hin, daß an den mikrosomalen Hydroxylierungen zwar sicher kein freies, aber möglicherweise irgendwie gebundenes Hydroperoxyd beteiligt ist. Der Steigerung der Proteinbindung durch Peroxydase entspricht der Befund, daß in Gegenwart des gleichen Enzyms praktisch kein o-Hydroxy-oestron isoliert werden kann; offensichtlich wird dessen Weiteroxydation und wahrscheinlich auch die oxydative Zerstörung des "Antioxydans" Tetrahydrofolsäure begünstigt.

Darüber hinaus sprechen frühere Befunde (49) und in dieser Arbeit durchgeführte Hemmexperimente für einen eisenhaltigen Cofaktor der mikrosomalen oestrogeninaktivierenden Oxygenase; die Vermutung, daß ein Haemoprotein aktiver Bestandteil dieses Enzymsystems ist, liegt somit nahe.

In der Tat erfüllen die in Lebermikrosomen nachgewiesenen Haemoproteine Cytochrom b₅ (125) und Cytochrom P-450 (126) die primär an eine mikrosomale Hydroxylase zu stellende Bedingung, daß sie die Reduktion von Sauerstoff durch Pyridinnukleotide katalysieren kann; jedoch nur Cytochrom P-450 hat eine genügend hohe Affinität zu Sauerstoff (125-127). Man kann daher annehmen, daß dieses Haemoprotein, welches wahrscheinlich mit dem durch Elektronenspinresonanzmessung entdeckten "mikrosomalen Fe³⁺" (127) identisch ist, eine aktive Komponente des mikrosomalen Hydroxylasesystems ist. Für diese Vermutung sprechen neben den schon genannten eine Reihe weiterer experimenteller Befunde:

1.) Zusammen mit der Neusynthese des "Hydroxylasesystems" (128-130) wird auch die Bildung der mikrosomalen Cyto-

- (125) P.Strittmatter in Boyer/Lardy/Myrbäck, The Enzymes, Bd.8, S.113; Academic Press, New York und London 1963
- (126) T.Omura, R.Sato, J.biol.Chemistry 237, PC 1375 (1962); Biochim.biophys.Acta 71, 224 (1963)
- (127) Y.Hashimoto, T.Yamano, H.S.Mason, J.biol.Chemistry 237, PC 3843 (1962)
- (128) H.Remmer, Symp.Redoxfunkt.cytoplasmatischer Strukturen, S.75, Wien 1962
- (129) J.Axelrod, J.Pharmacol.exp.Ther. 117, 322 (1956)
- (130) A.H.Conney, A.Klutch, J.biol.Chemistry 238, 1611 (1963)

chrome durch Substrate der Hydroxylierung induziert (130,131); gleichzeitig kann die Aktivität der "NADPH₂-Oxydase" zunehmen (132); die Induktion betrifft wahrscheinlich auch die mikrosomale Oestrogeninaktivierung (133).

- 2.) "Fe^x" (bzw. Cytochrom P-450) oxydiert NADPH₂ zwei- bis dreimal schneller als NADH₂ (127); das gleiche Verhältnis wurde in dieser Arbeit für o-Hydroxylierung und Proteinbindung des Oestrone gefunden.
- 3.) Cytochrom P-450 bildet unter Sauerstoff- und Lichtausschluß ein CO-Addukt; zwischen der Carbonylierung des Cytochroms und der CO-Hemmung einer mikrosomalen C21-Hydroxylase besteht ein direkter Zusammenhang (134).
- 4.) Cytochrom P-450 verliert seine Fähigkeit, die Pyridinnukleotidoxydation zu katalysieren, wenn es aus dem mikrosomalen Strukturverband herausgelöst wird (126, 127); dabei verschiebt sich seine Soret-Bande von 450 nach 420 mμ (normales Haemoproteinspektrum!). Damit übereinstimmend gelang es bisher nicht, das mikrosomale Oxygenesesystem in aktiver Form in Lösung zu bringen.

Der unter 4.) genannte Befund deutet darauf hin, daß bei den Isolierungsversuchen für Cytochrom P-450 möglicherweise ein strukturgebundener Partner, eventuell ein Flavoprotein (135-137), verlorengeht. Das Cytochrom könnte daher die terminale Oxydase einer mikrosomalen Elektronentransportkette ähnlich der Atmungskette sein, welche für die auch in Abwesenheit hydroxylierbarer Substrate ablaufende Oxydation von NADPH₂ verantwortlich ist.

Wie weiter unten gezeigt wird, steht diese aerobe NADPH₂-Dehydrierung mit den mikrosomalen Hydroxylierungsreaktionen offenbar in einem engen Zusammenhang.

Mit der Annahme einer mikrosomalen Haemoproteinhydroxylase können eine Reihe noch ungelöster Probleme - Unspezifität, möglicher radikalischer Mechanismus, Rolle der NADPH₂-Oxydation, Unterschied zwischen o- und p-Hydroxylierung des Oestrone - befriedigend erklärt werden. Die dem mikrosomalen

-
- (131) H.Remmer, H.J.Merker, Naturwissenschaften 50, 670 (1963)
 - (132) A.H.Conney, J.A.Michaelson, J.J.Burns, J.Pharmacol.exp. Ther. 132, 302 (1961)
 - (133) A.H.Conney, persönl. Mitteilung
 - (134) R.W.Estabrook, R.J.Cooper, O.Rosenthal, Biochem.Ztschr. 338, 741 (1963)
 - (135) H.Nishibayashi, T.Omura, R.Sato, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam) 67, 520 (1963)
 - (136) P.Hochstein, L.Ernster, Biochem.biophys.Res.Comm. 12, 388 (1963)
 - (137) A.H.Phillips, R.L.Langdon, J.biol.Chemistry 237, 2652 (1962)

Oxygenasesystem analog reagierenden Haemoproteine haben gemeinsam, daß sie mehrstufige radikalische Reduktionen des Sauerstoffs durch Wasserstoffdonatoren katalysieren können. Dieser Mechanismus gilt für Peroxydase als gesichert (138-141) und für Metmyoglobin (142) und Cytochromoxydase/Cytochrom c (124, 143-146) als wahrscheinlich. Da dabei offenbar nur mit den Redoxstufen des Sauerstoffs definierte Enzym-Substrat-Komplexe gebildet werden, ist die Reaktion gegenüber dem Wasserstoffdonator weitgehend unspezifisch. Mit diesen Vorgängen lassen sich - ebenfalls unspezifische - Oxygenase-Reaktionen, z.B. Hydroxylierungen (117, 118, 124, 147), koppeln, die wahrscheinlich durch die bei der Donatoroxydation entstehenden aktiven Enzym-Sauerstoffkomplexe eingeleitet werden. Während dabei schwer dehydrierbare Substrate wahrscheinlich durch sekundär entstehende Perhydroxylradikale angegriffen werden (118), kann man für leicht dehydrierbare Stoffe wie aromatische Amine, Phenole, Enole usw. postulieren, daß sie ebenso wie der Donator zunächst homolytisch dehydriert werden (141), worauf die entstandenen Radikale mit freiem oder enzymatisch gebundenem (aktiviertem) Sauerstoff zu hydroxylierten Produkten reagieren können. Dieser Mechanismus entspricht der Hypothese, die Hecker und Zayed für die Hydroxylierung der Oestrogene aufgestellt haben (50).

Bei spezifischen Hydroxylasen scheint der Sauerstoff in dem Maße, wie ihn der Donator(DH_2) aktiviert, vom Substrat "verbraucht" zu werden

-
- (138) P.Nicholls in O.Hayaishi, Oxygenases, S.273, Academic Press, New York und London, 1962
 - (139) I.Yamazaki, L.H.Piette, Biochim.biophys.Acta (Amsterdam) 77, 47 (1963)
 - (140) K.G.Paul in Boyer/Lardy/Myrbäck, The Enzymes, Bd. 8, S.227; Academic Press, New York und London, 1963
 - (141) H.S.Mason, I.Yamazaki, L.Piette, J.biol.Chemistry 235, 2444 (1960)
 - (142) N.K.King, M.E.Winfield, J.biol.Chemistry 238, 1520 (1963)
 - (143) L.Michaelis in Sumner/Myrbäck, The Enzymes, Bd.2, Teil I, S.1; Academic Press, New York und London, 1951
 - (144) T.E.King, C.P.Lee, Biochim.biophys.Acta 37, 342 (1960)
 - (145) S.Fallab, Chimia 16, 189 (1962)
 - (146) Y.Orii, K.Okunuki, J.Biochemistry 53, 489 (1963); 54, 207 (1963)
 - (147) H.S.Mason, Proc.intern.Symp.Enzyme Chemistry, Tokio 1958 S.220

Nach dieser Formulierung sollte der Zusatz von RH (z.B. Oestron) zu einem NADPH₂ enthaltenden Inkubationsansatz (in dem Reaktion 1 abläuft) die zusätzlich NADPH₂ verbrauchende Reaktion 2 starten und damit die Bruttoverbrauchsgeschwindigkeit des Donators erhöhen. Wie Ergebnisse dieser Arbeit und entsprechende Befunde anderer Autoren (86,148) zeigen, ist das jedoch nicht der Fall. Man muß daraus schließen, daß NADPH₂-Oxydation und Hydroxylierung nicht unabhängig nebeneinander ablaufen, sondern in der oben dargestellten Weise miteinander zusammenhängen:



Das Problem wird dadurch kompliziert, daß RH möglicherweise nicht direkt mit NADPH₂, sondern mit einem noch unbekannten Glied einer vom NADPH₂ zum Sauerstoff führenden mikrosomalen Redoxkette um den an der terminalen Oxydase aktivierten Sauerstoff konkurriert (s.o.). Piha (124) hat einen analogen Fall am Beispiel der Benzpyrenhydroxylierung durch Cytochromoxydase/Cytochrom c genauer untersucht.

Die aerobe NADPH₂-Dehydrierung ist sozusagen der "Generator" für aktiven Sauerstoff, welcher - wahrscheinlich in Form intermediärer Enzym-Sauerstoff-Komplexe - unspezifische Oxygenierungen katalysieren kann.

Je schneller die Donator-Oxydation abläuft, desto geringer wird für hydroxylierbare Substrate die Möglichkeit, um Enzymkomplexe der Sauerstoffaktivierung zu konkurrieren (124). Daher werden Stoffe, welche die NADPH₂-Oxydation beschleunigen, z.B. Cytochrom c, aber auch Flavine und Naphthochinone (103), die Hydroxylierungen zumeist hemmen. In einigen Fällen, z.B. bei Cytochrom c, kann man sich jedoch auch vorstellen, daß die Reduktionsäquivalente des NADPH₂ auf einem nicht zur Hydroxylierung führenden Nebenweg "abgeleitet" werden. Dagegen sollten partielle Inhibitoren der NADPH₂-Oxydation unter Umständen zu erhöhter Hydroxylierung führen; auf diese Weise erklärt sich die Wirkung von Zellüberstand, Trispuffer, o-Phenanthrolin und α, α' -Dipyridyl auf die o-Hydroxylierung und Proteinbindung des Oestrone.

Schwieriger ist die Hemmung der Oestronhydroxylierung durch Cyanid und Azid zu deuten, da beide Inhibitoren die NADPH_2 -Oxydation nicht beeinflussen; möglicherweise behindern Sie in irgendeiner Weise den Zutritt des Substrates zum aktiven Zentrum der Sauerstoffreduktion.

Die vielfältigen Analogien zu Haemoproteinoxidasen und der Befund, daß der Sauerstoff im Verlaufe der NADPH_2 -Oxydation nur bis zur Stufe des Hydroperoxyds reduziert wird (86,87), erlauben es, mit allem Vorbehalt einen möglichen Mechanismus der mikrosomalen Sauerstoffaktivierung und der damit verbundenen Oestronhydroxylierungen zur Diskussion zu stellen. Danach soll die Reduktion $\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$ an einem eisenhaltigen Cofaktor (Haemoprotein?) in zwei Einelektronen-übergängen erfolgen; die Reduktionsäquivalente werden von NADPH_2 - eventuell über noch unbekannte zwischengeschaltete Redoxstufen - eingebracht. Abbildung 26, die im Prinzip der für Haemoproteinoxidasen üblichen Formulierung (vgl. z.B. 139,142,143) entspricht, veranschaulicht diese Reaktion.

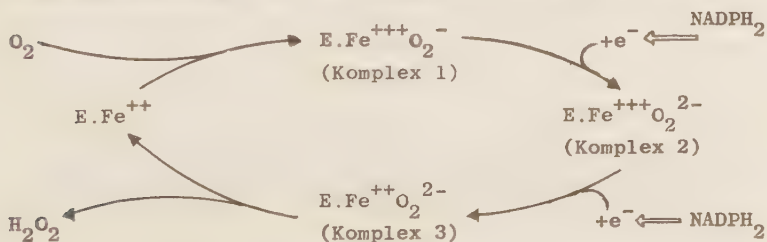
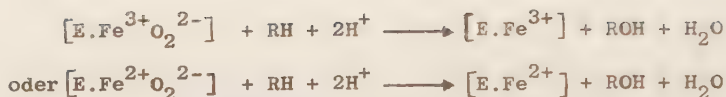


Abb. 26: Hypothetischer Mechanismus der Sauerstoffaktivierung durch die mikrosomale Oxygenase (NADPH_2 -Oxydase).

Diese Hypothese führt zu einigen interessanten Folgerungen für den Ablauf der Oestronhydroxylierungen. Man erkennt, daß eine von NADPH_2 abhängige Hydroxylierung nur durch die Komplexe 2 oder 3, nicht aber durch Komplex 1, eingeleitet werden kann. Eine derartige Reaktion, die, wie oben beschrieben, im "Nebenschluß" der NADPH_2 -Dehydrierung liegt, ist dann wie folgt zu formulieren:



In beiden Fällen handelt es sich im Prinzip um eine Hydroxylierung durch (enzymatisch aktiviertes) Hydroperoxyd ($\text{RH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$). Auf diese Weise läßt sich die auffallende Ähnlichkeit der mikrosomalen Oxygenasereaktionen mit peroxyabhängigen Oxydationen (vgl. S. 78) deuten. Die Bevorzugung bestimmter Stellungen (2 gegenüber 4, 6α und 16α gegenüber 6β und 16β) bei der Hydroxylierung des Oestrans spricht darüber hinaus für eine gewisse Orientierung des Substrates am Enzym; möglicherweise verlaufen Primärdehydrierung und Oxygenierung in einem - durch Abb. 27 veranschaulichten - Synchronprozeß:

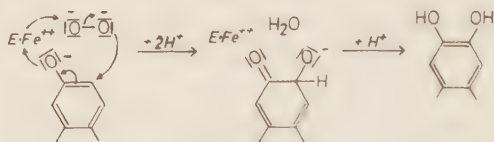


Abb. 27: Möglicher Mechanismus der mikrosomalen o-Hydroxylierung des Oestrans (ähnliche Formulierungen lassen sich auch für 6- und 16-Hydroxylierung postulieren).

Die dieser Formulierung zugrunde liegende homolytische Spaltung der O-O-Bindung durch Ferroeisen ist ein aus der Chemie der schwermetallkatalysierten Autoxydationen gut bekannter Vorgang (149).

Ein derartiger Synchronmechanismus wird für die p-Hydroxylierung des Oestrans aus sterischen Gründen nicht ohne weiteres möglich sein, da der Abstand zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe und der p-Stellung in einem Enzym-Sauerstoff-

(149) E.S.Gould, Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie, S. 862 ff; Verlag Chemie, Weinheim-Bergstr., 1962

Komplex der geschilderten Art wahrscheinlich nicht überbrückt werden kann. Hydroxylierungen durch enzymatisch gebundenes Peroxyd, d.h. durch Komplex 2 oder 3, sollten daher nur zu o-Hydroxy-oestronen (eventuell auch 6- und 16-Hydroxy-oestronen) führen. Wahrscheinlich ist hier die Ursache für das abweichende Verhalten der p-Hydroxylierung zu suchen.

Diese Reaktion scheint nämlich nicht wie die o-Hydroxylierung mit der mikrosomalen NADPH_2 -Oxydation verknüpft zu sein, da sie nur sehr wenig, oft sogar kein NADPH_2 erfordert, durch Cytochrom c nicht gehemmt wird, eine auch bei tiefer Temperatur noch hohe Geschwindigkeit hat und nach kurzer Zeit zum Stillstand zu kommen scheint. Wahrscheinlich verläuft sie in der auf S. 75 beschriebenen, dem Mechanismus der autoxydativen p-Chinolbildung (97) analogen Weise, d.h. der katalytischen Primärdehydrierung zum Aroxyldradikal folgt eine Oxygenierung durch Luftsauerstoff in p-Stellung. Die beobachtete partielle NADPH_2 -Abhängigkeit könnte dadurch zustande kommen, daß das Oxygenierungsprodukt p-Alkylhydroperoxyd leichter reduktiv (durch NADPH_2) als hydrolytisch in p-Chinol umgewandelt wird (vgl. auch (52)). Hemmversuche zeigen, daß das dehydrierende Agens ein offensichtlich eisenhaltiges Ferment mit aktiven SH-Gruppen ist. Ob es sich hierbei um eine Struktur der mikrosomalen Hydroxylase handelt, welche sich auch in Abwesenheit von NADPH_2 bildet (z.B. Komplex 1 oder autoxydativ entstandenes Ferrienzym) oder um ein anderes Metalloenzym (Cytochrom b_5 ?), muß dahingestellt bleiben. Der eisenhaltige Cofaktor scheint jedoch auch noch nach der Hitzedenaturierung des Enzyms eine autoxydative p-Hydroxylierung katalysieren zu können; ein derartiger Effekt ist nach der auf S. 75 wiedergegebenen Formulierung zu erwarten.

Z u s a m m e n f a s s u n g

- 1.) Rattenleber ist in der Lage, Oestron in vitro in schneller Reaktion umzuwandeln; der Umsatz wird durch NADPH_2 gesteigert und ist in der Mikrosomenfraktion am höchsten.
- 2.) Die nach kurzer Zeit auftretenden ätherlöslichen Metaboliten werden bei längerer Inkubation nahezu vollständig in proteingebundene und wasserlösliche Produkte umgewandelt; dieser Vorgang wird durch Zellüberstand gefördert.
- 3.) Unter den ätherlöslichen Primärmetaboliten findet man in den Positionen 1,2,4,6 α ,10 β und 16 α (16 β) hydroxylierte Oestrone, von denen 1- und 4-Hydroxy-oestron und 17-Oxo-oestra-p-chinol-(10 β) erstmalig nachgewiesen wurden, sowie unmittelbare Folgeprodukte wie 6- und 16-Oxo-oestron. Dominierendes Stoffwechselprodukt ist 2-Hydroxy-oestron. Sämtliche Hydroxylierungen sowie die Dehydrierungen der 6- und 16-ständigen Hydroxylgruppen werden durch ein mikrosomales Enzymsystem katalysiert.
- 4.) Beide o-Hydroxy-oestrone sind nur in Gegenwart von Zellüberstand oder Tetrahydrofolsäure in größeren Mengen faßbar; das Tetrahydropteridin spielt eine andere Rolle als bei der bekannten Hydroxylierung des Phenylalanins; wahrscheinlich hemmt es ebenso wie der unbekannte Überstandsfaktor eine vom o-Hydroxy-oestron ausgehende und zur Bildung proteingebundener Metaboliten führende Folgereaktion, welche durch kinetische Messungen nachgewiesen wurde.
- 5.) o- und p-Hydroxylierung verlaufen nach verschiedenen Reaktionsmechanismen, werden aber möglicherweise trotzdem durch das gleiche Enzymsystem katalysiert.
- 6.) 6- und 16-hydroxylierte Oestrone sind ebenso wie 16-Oxo-oestron nur kurze Zeit faßbar, da sie durch das mikroso-

male Enzymsystem rasch weiterverändert werden. Mögliche Folgereaktionen werden diskutiert.

- 7.) Mit Ausnahme der p-Hydroxylierung sind die hier untersuchten Reaktionen eindeutig an die Gegenwart von NADPH_2 gebunden; weiterer Reaktionspartner scheint in allen Fällen Sauerstoff zu sein.

Am Beispiel der 2-Hydroxylierung wird gezeigt, daß der NADPH_2 -Bedarf weit größer ist, als es der Stöchiometrie einer spezifischen gemischt-funktionellen Oxygenasereaktion entspricht. Die Hydroxylierung scheint daher im "Nebenschluß" der mikrosomalen NADPH_2 -Oxydation zu liegen; in der Tat wird diese Reaktion, welche gesondert untersucht wird, durch Oestron nicht beschleunigt.

- 8.) Das hydroxylierende Fermentsystem ist ein wahrscheinlich eisenhaltiges Metalloenzym mit aktiven SH-Gruppen. Es zeigt gewisse Ähnlichkeiten mit Peroxydasen. Seine Identität mit dem mikrosomalen Cytochrom P-450, welches wahrscheinlich die terminale aerobe Oxydase einer Elektronentransportkette ist, wird diskutiert.

- 9.) Die Betrachtung von Analogiebeispielen erlaubt es, einen enzymatischen Mechanismus zu postulieren, der eine befriedigende Deutung der Ergebnisse dieser Arbeit sowie weiterer unspezifischer mikrosomaler Oxygenasereaktionen ermöglicht.

Lebenslauf

Am 17. Dezember 1936 wurde ich, Friedrich Marks, in Berlin-Lichterfelde als Sohn des Offiziers Carl Marks und seiner Ehefrau, der Pianistin Johanna M., geb. Reddemann, geboren.

Nach Besuch der Grundschule in Neisse/Oberschlesien und Berlin sowie der Oberschule in Berlin und Detmold legte ich 1956 meine Reifeprüfung am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium "Leopoldinum" in Detmold ab. Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich an der Philipps-Universität Marburg mit dem Studium der Chemie, welches ich nach der Diplom-Vorprüfung im Januar 1959 an der Ludwig-Maximilians-Universität München fortsetzte und mit der Diplom-Hauptprüfung im April 1961 sowie der Annahme der Diplom-Arbeit am 1. Mai 1962 abschloß. Die Diplom-Arbeit zum Thema "Über die p-Hydroxylierung des Oestrans in Rattenleber" bildet einen Teil der vorliegenden Dissertation.

